

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELO BATISTA FORNARI

INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES ASSOCIADOS AO
DESENVOLVIMENTO ÓSSEO COMO MARCADORES MOLECULARES PARA
CARACTERÍSTICAS DE INTEGRIDADE ÓSSEA EM UMA LINHAGEM PATERNA
DE FRANGOS DE CORTE

CURITIBA

2012

MARCELO BATISTA FORNARI

INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES ASSOCIADOS AO
DESENVOLVIMENTO ÓSSEO COMO MARCADORES MOLECULARES PARA
CARACTERÍSTICAS DE INTEGRIDADE ÓSSEA EM UMA LINHAGEM PATERNA
DE FRANGOS DE CORTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, área de concentração em Saúde Humana e Animal, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol
Co-orientadora: Dr.^a Jane de Oliveira Peixoto

CURITIBA

2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Moacir e Inês, aos meus irmãos César, Evandro e Marcos e a minha irmã Rose, por todo incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e a coordenação do curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, nas pessoas do Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol e da Prof. Dr.^a Luciana Vandenberghe, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional e científico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

À Embrapa Suínos e Aves, por abrir as portas dos laboratórios de Sanidade e Genética Animal e de Análises Físico-Química.

À Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol, pela orientação, amizade e ensinamentos recebidos.

À Dr.^a Jane de Oliveira Peixoto, pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu projeto de pesquisa, pela co-orientação, amizade e conhecimentos recebidos.

À Dr.^a Mônica Corrêa Ledur, pelo incentivo, apoio e colaboração à realização deste trabalho.

Aos estagiários e funcionários dos laboratórios da Embrapa Suínos e Aves, em especial a Alexandre Luis Tessmann, André Schnorr (*in memoriam*), Arlei Coldebella, Edimara Peri, Gislaine Fongaro, João Batista Ribeiro, Jorge Augusto Petrolí Marchesi, José Rodrigo Pandolfi, Karina Luzia Neis, Magda Viera Benavides e Vicky Kowski pelos conselhos, colaboração e os bons momentos de convivência e amizade.

Aos meus pais, Moacir e Inês, aos meus irmãos César, Evandro e Marcos e a minha irmã Rose pelo apoio, carinho e incentivo.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | VI |
| LISTA DE TABELAS | IX |
| RESUMO..... | XII |
| ABSTRACT | XIII |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 14 |
| 2. OBJETIVOS..... | 17 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 17 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 17 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA..... | 18 |
| 3.1. PRODUÇÃO AVÍCOLA | 18 |
| 3.1.1. Panorama mundial..... | 18 |
| 3.1.2. Panorama nacional..... | 19 |
| 3.2. MELHORAMENTO GENÉTICO DE AVES | 22 |
| 3.2.1. Histórico..... | 22 |
| 3.2.2. Benefícios do melhoramento | 23 |
| 3.2.3. Desafios a serem vencidos..... | 24 |
| 3.3. TECIDO ÓSSEO | 25 |
| 3.3.1. Estrutura óssea..... | 25 |
| 3.3.2. Anomalias ósseas em aves | 27 |
| 3.4. BIOTECNOLOGIA APLICADA AO MELHORAMENTO DE AVES | 29 |
| 3.4.1. Genômica avícola | 29 |
| 3.4.2. Marcadores moleculares | 30 |
| 3.4.3. Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) | 31 |
| 3.5. GENES CANDIDATOS..... | 33 |
| 3.5.1. Osteoprotegerina | 33 |
| 3.5.2. Sialoproteína óssea | 34 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 36 |

CAPÍTULO I – SEQUENCIAMENTO E DESCOBERTA DE POLIMORFISMOS EM GENES RELACIONADOS À INTEGRIDADE ÓSSEA EM LINHAS PURAS DE AVES

| | |
|---------------------------------|----|
| RESUMO..... | 43 |
| ABSTRACT | 43 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 44 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 45 |
| 2. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 52 |
| 3. CONCLUSÕES..... | 72 |
| 4. REFERÊNCIAS | 72 |

CAPÍTULO II – IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES NOS GENES OPG E IBSP E SEUS EFEITOS SOBRE CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO, CARCAÇA E ESTRUTURA ÓSSEA EM UMA LINHAGEM PATERNA DE FRANGOS DE CORTE

| | |
|-------------------------------------|-----|
| RESUMO..... | 75 |
| ABSTRACT | 76 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 76 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 78 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 87 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 116 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 116 |
| 5. CONCLUSÕES GERAIS | 120 |
| APÊNDICES..... | 120 |

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Desempenho (em porcentagem) dos principais estados brasileiros exportadores de carne de frango no ano de 2009. Fonte: Modificado ABEF (2010). 20

FIGURA 2– Exportações de carne de frango por segmento. Fonte: Modificado (2010) 21

FIGURA 3 – Secção longitudinal do fêmur. Esquerdo: Imaturo (placas de crescimento abertas). Direito: Maduro (placas de crescimento fundidas). Fonte: Modificado Frandson (2005). 26

CAPÍTULO I – SEQUENCIAMENTO E DESCOBERTA DE POLIMORFISMOS EM GENES RELACIONADOS À INTEGRIDADE ÓSSEA EM LINHAS PURAS DE AVES

FIGURA 1 – Reprodutor macho da linhagem de corte TT. Fonte: Embrapa Suínos e Aves (2011) 46

FIGURA 2 – Ave de postura adulta da linhagem CC. Fonte: Embrapa Suínos e Aves (2011). 47

FIGURA 3 – Principais etapas envolvidas no sequenciamento e identificação de polimorfismos 47

FIGURA 4 – Avaliação das condições de amplificação para os *primers* bmp2_p2, ibsp_p1, ibsp_p2, spp1_p1, spp1_p2, spp1_p3, opg_p1, opg_p2, opg_p3, e opg_p4 com amostras de DNA, aplicadas em gel de agarose 1% 53

FIGURA 5 – Avaliação das condições de amplificação para os pares de *primer* runx2_p1, runx2_p2, sost_p1, sost_p2, calb_p1 e calb_p4 com amostras de DNA, aplicadas em gel de agarose 1% 54

FIGURA 6 – Fragmentos amplificados com os *primers* ibsp_p2 e opg_p2 com redução na concentração de MgCl₂ 50mM, aplicadas em gel de agarose 1% 55

FIGURA 7 – Avaliação das condições de amplificação para os pares de *primer* opg_p2, opg_p3, opg_p4, spp1_p1 e spp1_p2 com amostras de DNA padrão, aplicadas em gel de agarose 1% 56

FIGURA 8 – Parte do cromatograma de uma das amostras sequenciadas 59

FIGURA 9 – SNPs identificados no *contig* do fragmento gerado com o *primer* calb_p1 e suas respectivas posições 59

| | |
|--|----|
| FIGURA 10 – SNPs identificados no <i>contig</i> do fragmento gerado com o <i>primer</i> calb_p4 e suas respectivas posições | 59 |
| FIGURA 11 – SNPs identificados no <i>contig</i> do fragmento gerado com o <i>primer</i> ibsp_p2 e suas respectivas posições | 63 |
| FIGURA 12 – SNPs identificados no <i>contig</i> do fragmento gerado com o <i>primer</i> opg_p1 e suas respectivas posições | 64 |
| FIGURA 13 – SNPs identificados no <i>contig</i> do fragmento gerado com o <i>primer</i> runx2_p1 e suas respectivas posições | 66 |
| FIGURA 14 – SNPs identificados no <i>contig</i> do fragmento gerado com o <i>primer</i> runx2_p2 e suas respectivas posições | 67 |
| FIGURA 15 – SNPs identificados no <i>contig</i> do fragmento gerado com o <i>primer</i> sost_p1 e suas respectivas posições | 68 |
| FIGURA 16 – Polimorfismos identificados no <i>contig</i> do fragmento gerado com o <i>primer</i> sost_p2 e suas respectivas posições | 69 |
| FIGURA 17 – SNPs identificados no <i>contig</i> do fragmento gerado com o <i>primer</i> spp1_p3 e suas respectivas posições | 70 |

CAPÍTULO II – IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES NOS GENES OPG E IBSP E SEUS EFEITOS SOBRE CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO, CARCAÇA E ESTRUTURA ÓSSEA EM UMA LINHAGEM PATERNA DE FRANGOS DE CORTE

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Amostras extraídas com o reagente DNAzol e aplicadas em gel de agarose 1%, acompanhadas do marcador de peso molecular (plasmídeo pGEN – 25ng/ µL) | 88 |
| FIGURA 2 – Amostras após diluição com H ₂ O ultra pura, aplicadas em gel de agarose 1% e acompanhadas do marcador de peso molecular (plasmídeo pGEN – 25ng/ µL)..... | 88 |
| FIGURA 3 – Amostras da população referência TT amplificadas com o <i>primer</i> opg_p1 e aplicadas em gel de agarose 1%..... | 89 |
| FIGURA 4 – Sequência de nucleotídeos reconhecida pela enzima, com destaque para o sítio polimórfico em vermelho | 89 |
| FIGURA 5 – Amostras de aves da população referência TT após clivagem com a enzima <i>Bsr</i> I, aplicadas em gel de agarose 1%..... | 90 |
| FIGURA 6 – Amostras da população referência TT, amplificadas a partir do <i>primer</i> ibsp_p2 e aplicadas em gel de agarose 1% | 91 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 7 – Avaliação das condições de amplificação sob diferentes concentrações de $MgCl_2$ e temperaturas de anelamento, em amostras da população referência TT aplicadas em gel de agarose 1% | 92 |
| FIGURA 8 – Avaliação das condições de amplificação com diferentes concentrações de DNA genômico, aplicadas em gel de agarose 1% | 93 |
| FIGURA 9 – Sequência de nucleotídeos reconhecida pela enzima, com destaque para o sítio polimórfico em vermelho | 94 |
| FIGURA 10 – Amostras da população referência TT após clivagem com a enzima <i>Hpa II</i> , aplicadas em gel de agarose 1% | 95 |
| FIGURA 11 – Médias estimadas para o peso ao nascer em machos e fêmeas da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C | 100 |
| FIGURA 12 – Médias estimadas, com o respectivo erro padrão para peso ao nascer em machos (a) e fêmeas (b) da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C | 100 |
| FIGURA 13 – Médias estimadas, com o respectivo erro padrão para peso aos 21 dias em aves da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C | 102 |
| FIGURA 14 – Médias estimadas, com o respectivo erro padrão para peso aos 35 dias em aves da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C | 102 |
| FIGURA 15 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para peso aos 42 dias em aves da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C | 103 |
| FIGURA 16 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para peso de asas em aves da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C | 105 |
| FIGURA 17 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para resistência à flexão da tíbia em aves da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C | 106 |
| FIGURA 18 – Médias estimadas para o rendimento de cabeça em aves da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C | 106 |
| FIGURA 19 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para rendimento de cabeça em machos da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C | 107 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 20 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para o peso da pele das coxas em aves da população referência TT, em relação aos genótipos AA, AG e GG do SNP IBSP A211G | 109 |
| FIGURA 21 – Médias estimadas para a espessura da tíbia em fêmeas da população referência TT, em relação aos genótipos AA, AG e GG do SNP IBSP A211G | 111 |
| FIGURA 22 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para o peso médio do osso do peito em fêmeas da população referência TT, em relação aos genótipos AA, AG e GG do SNP IBSP A211G | 113 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – SEQUENCIAMENTO E DESCOBERTA DE POLIMORFISMOS EM GENES RELACIONADOS À INTEGRIDADE ÓSSEA EM LINHAS PURAS DE AVES

| | |
|--|----|
| TABELA 1 – Gene, sequência, número de acesso ao <i>GenBank</i> , localização e tamanho do fragmento amplificado por cada conjunto de <i>primer</i> | 48 |
| TABELA 2 – Volumes e concentrações dos componentes usados na reação em cadeia da polimerase – PCR | 53 |
| TABELA 3– Concentração de $MgCl_2$ e temperatura de anelamento padronizadas para cada par de <i>primer</i> | 57 |
| TABELA 4 e 5 – Concentrações médias após reação de PCR para cada par de <i>primer</i> | 58 |
| TABELA 6 e 7 – Número de SNPs identificados após análises nos programas <i>Standen Package</i> , <i>Clustal</i> e <i>Phred/Phrap/Consed</i> | 60 |
| TABELA 8 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no <i>contig</i> amplificado a partir do <i>primer</i> calb_p1 | 61 |
| TABELA 9 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no <i>contig</i> amplificado a partir do <i>primer</i> calb_p4 | 62 |
| TABELA 10 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no <i>contig</i> amplificado a partir do <i>primer</i> ibsp_p2 | 63 |
| TABELA 11 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no <i>contig</i> amplificado a partir do <i>primer</i> opg_p1 | 64 |
| TABELA 12 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no <i>contig</i> amplificado a partir do <i>primer</i> runx2_p1 | 66 |

TABELA 13 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* runx2_p2 67

TABELA 14 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* sost_p1 68

TABELA 15 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os polimorfismos detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* sost_p2 69

TABELA 16 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* spp1_p3..... 70

CAPÍTULO II – IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES NO GENES OPG E IBSP E SEUS EFEITOS SOBRE CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO, CARÇA E ESTRUTURA ÓSSEA EM UMA LINHAGEM PATERNA DE FRANGOS DE CORTE

TABELA 1 – Estrutura da população referência TT 78

TABELA 2 – Características avaliadas entre o nascimento e o abate..... 79

TABELA 3 – Características de carcaça e partes avaliadas após quatro horas de resfriamento..... 79

TABELA 4 – Características de rendimento avaliadas 80

TABELA 5 – Volumes e concentrações dos reagentes usados na reação de clivagem com a enzima *Bsr I* 90

TABELA 6 – Volumes e concentrações dos componentes usados na reação de PCR 93

TABELA 7 – Volumes e concentrações dos componentes para a reação de PCR com o *primer* ibsp_p2 em amostras na população referência TT 94

TABELA 8 – Volumes e concentrações dos reagentes usados na reação de clivagem com a enzima *Hpa II*..... 94

TABELA 9 – Frequência genotípica do SNP OPG G217C na população referência TT 96

TABELA 10 – Frequência genotípica do SNP IBSP A211G na população referência TT 96

TABELA 11 – Número de animais (N), média (Med.), desvio-padrão (DP), Mínimo (Min.) e Máximo (Max.) para algumas características ósseas avaliadas..... 97

TABELA 12 – Probabilidades obtidas na análise de variância pelo teste F para algumas características ósseas do SNP OPG G217C 98

| | |
|---|-----|
| TABELA 13 – Probabilidades obtidas na análise de variância pelo teste F para algumas características ósseas do SNP IBSP A211G | 99 |
| TABELA 14 – Valor do <i>P-value</i> , efeito aditivo estimado do SNP e erro padrão para algumas características com influência significativa do SNP OPG G217C | 104 |
| TABELA 15 – Valor do <i>P-value</i> , efeito aditivo estimado do SNP e erros padrão para machos e fêmeas com relação ao peso aos 41 dias | 108 |
| TABELA 16 – Valor do <i>P-value</i> , efeito aditivo estimado do SNP e erros padrão para machos e fêmeas para peso do coração e peso do filé do peito | 110 |
| TABELA 17 – Valor do <i>P-value</i> , efeito aditivo estimado do SNP e erro padrão para peso da coxa das asas e peso das asas em fêmeas e machos da população referência TT | 110 |
| TABELA 18 – Valor do <i>P-value</i> , efeitos aditivo e dominante estimados do SNP e respectivos erros padrão em relação à espessura da tíbia em machos e fêmeas da população referência TT | 111 |
| TABELA 19 – Valor do <i>P-value</i> , efeito aditivo estimado do SNP e erro padrão para a espessura da tíbia em fêmeas e machos da população referência TT | 112 |
| TABELA 20 – Valor do <i>P-value</i> , efeito aditivo estimado do SNP e erro padrão para o peso do osso do peito em fêmeas e machos da população referência TT | 113 |

RESUMO

Modernos sistemas de produção combinados ao planejamento e organização, fazem do Brasil o maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de frango e seus derivados. Avanços significativos foram alcançados nas últimas décadas, especialmente para características como a conversão alimentar, período até o abate, taxa de crescimento e porcentual de gordura. A elevada taxa de crescimento, no entanto, deixou mais evidente a necessidade de programas de melhoramento que aliem características relacionadas ao crescimento e bem estar animal, a uma maior eficiência e rendimento. Um dos problemas observados diz respeito à má formação óssea, consequência de uma taxa de crescimento corporal que é desproporcional em relação ao desenvolvimento ósseo. Medidas para reduzir perdas envolvendo problemas ósseos vêm sendo estudadas. O uso de marcadores moleculares, em especial SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único), tem sido uma das alternativas propostas. Neste trabalho foram sequenciados fragmentos dos genes calbidina, fator de transcrição “*runt-related*”, osteopontina, osteoprotegerina, proteína morfogenética óssea dois, sialoproteína óssea e osteopontina, em dez amostras de DNA de aves de uma linhagem de corte e cinco amostras de uma linhagem de postura, pertencentes ao programa de melhoramento da Embrapa Suínos e Aves. Os polimorfismos foram identificados pela análise nos programas *Standen Package*, *Clustal* e *Phred/Phrap/Consed/Polyphred*. Foram identificados 92 SNPs e um Indel (Inserção-Deleção). Dois polimorfismos do tipo SNP, um no gene osteoprotegerina (OPG G217C) e outro na sialoproteína óssea (IBSP A211G) foram selecionados e genotipados por PCR-RFLP em quinhentas e dez aves de uma população referência desenvolvida para estudos na área de genômica de aves. Os resultados da genotipagem foram avaliados pela análise de associação no programa QxPaK v. 4.1 com oitenta características de desempenho, carcaça e estrutura óssea. O SNP OPG G217C apresentou associação significativa para o peso ao nascer ($P=0.107 \times 10^{-10}$), peso aos 21 ($P=0.004$), aos 35 ($P=0.04$) e aos 42 dias ($P=0.01$). Também foi observada associação com o peso das asas ($P=0.005$), peso do osso do peito ($P=0.02$) e resistência a flexão da tíbia ($P=0.05$). Já o SNP IBSP A211G demonstrou resultados significativos para o peso aos 41 dias ($P=0.03$), peso do filé do peito ($P=0.006$), peso das asas ($P=0.01$), peso do osso do peito ($P=0.008$) e espessura da tíbia ($P=0.005$). Além destas, outras características de desempenho e carcaça demonstraram resultados significativos para os SNPs OPG G217C e IBSP A211G. Novas investigações poderão ser feitas em futuros trabalhos, para que estes e outros SNPs sejam usados como marcadores genéticos na seleção de aves com melhor estrutura óssea.

Palavras chave: Integridade óssea. Marcadores moleculares. Polimorfismo de nucleotídeo único. Osteoprotegerina. Sialoproteína óssea. *Gallus gallus*.

ABSTRACT

Modern production systems combined with planning and organization, making Brazil the largest exporter and the third largest producer of chicken meat in the world. Significant advances have been achieved in recent decades, especially for features like feed conversion, time until slaughter, growth rate and fat percentage. The high growth rate, however, showed more evidently the necessity of breeding programs that combine features of growth and animal welfare, with greater efficiency and performance. One problem is the poor bone formation, resulting from a disproportionate growth rate compared with the bone tissue development. Actions to reduce losses involving bone problems have been developed. The use of molecular markers, especially SNPs (single nucleotide polymorphisms) has been one of proposed alternatives. In this study we sequenced fragments of calbindin, transcription factor “run-related”, osteopontin, osteoprotegerin, bone morphogenetic protein two, bone sialoprotein and osteopontin in ten DNA samples of chicken from a broiler line and five from a layer line, belonging to the breeding program at Embrapa Swine and Poultry Research Center. The polymorphisms were identified by analysis in Standen Package, Clustal and Phred/Phrap/Consed/Polyphred. We identified 92 SNPs and one Indel (Insertion-Deletion). Two SNP polymorphisms, one in osteoprotegerin gene (OPG G217C) and another one in bone sialoprotein gene (IBSP A211G) were genotyped by PCR-RFLP in five hundred and ten chickens from a reference population developed for studies in chicken genomics by Embrapa Swine and Poultry Research Center. The genotyping results were evaluated by association analysis in QxPaK v. 4.1 software, with eighty performance, carcass and bone structure traits. The SNP OPG G217C showed significant association to birth weight ($P=0.107 \times 10^{-10}$), weight at 21 ($P=0.004$), at 35 ($P=0.04$) and 42 days ($P=0.01$). Association was also observed with weight wings ($P=0.005$), weight breast bone ($P=0.02$) and bending resistance of tibia ($P=0.05$). To SNP IBSP A211G, significant association was observed to weight at 41 days ($P=0.03$), weight of breast fillet ($P=0.006$), wing weight ($P=0.01$), weight of breast bone ($P=0.008$) and thickness of the tibia ($P=0.005$). In addition, other performance features and carcass, demonstrated significant results for the OPG G217C and IBSP A211G SNPs. New investigations may be explored in future researches to evaluate the use of these SNPs and others, as genetic markers in chicken selection for a better bone structure.

Keywords: Bone integrity. Molecular markers. Single nucleotide polymorphism. Osteoprotegerin. Bone sialoprotein. *Gallus gallus*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção agroindustrial é um importante negócio responsável pela geração de riquezas, empregos e produtos destinados a atender uma grande diversidade de mercados consumidores. O Brasil, um país com ampla oferta de recursos naturais, tem no agronegócio um de seus principais propulsores econômicos. Seja pela produção agrícola ou agropecuária, o *agrobusiness* como é comumente chamado, é responsável por inúmeros empregos diretos e indiretos e contribui para o desenvolvimento econômico e social do país.

Um dos principais setores deste mercado é o segmento avícola. O Brasil ocupa a posição de maior exportador e terceiro maior produtor mundial de carne de frango e derivados. Contudo o país depende de inúmeros insumos e tecnologias desenvolvidos em outros países (SILVA, 2009). Os custos destes produtos importados, em geral são elevados, o que reforça a necessidade de incentivar o desenvolvimento de tecnologias nacionais que atendam as exigências brasileiras e internacionais. Para isso é necessário que o país invista em pesquisas que permitam melhorias na qualidade, produção, bem estar animal, rastreabilidade, desenvolvimento de novos produtos, melhoramento genético de linhagens e formação de recursos humanos capacitados para o desenvolvimento de pesquisas avançadas.

O melhoramento genético em especial, precisa ser estimulado e desenvolvido de maneira a atender as necessidades específicas dos produtores brasileiros. Nas últimas décadas as empresas de genética têm se empenhado no sentido de propiciar linhagens mais produtivas. Esforços foram empregados, especialmente para melhorar características como a qualidade da carne (STRINGHINI *et al.*, 2003), redução do porcentual de gordura (GAYA *et al.*, 2005) e rendimento de carcaça (STRINGHINI *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2005). Avanços significativos foram alcançados nos níveis de conversão alimentar e período até o abate (LEDUR *et al.*, 2007; MENDES, 2010). No entanto ainda há muito a se fazer para aliar características produtivas, de crescimento, qualidade, bem estar animal e maximização de perdas na produção de frangos.

A elevada taxa de crescimento atingida nas últimas décadas, por exemplo, deixou mais evidente a necessidade de um melhoramento equilibrado (APPLEGATE *et al.*, 2002). Um dos problemas que tem sido observado, diz respeito à má

formação óssea, como consequência de uma taxa de crescimento corporal que é desproporcional em relação ao desenvolvimento do tecido ósseo (JULIAN, 1998; VIANNA *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2007).

A integridade óssea é um fator relevante na produção de frangos de corte e poedeiras, pois interfere direta ou indiretamente em importantes características. A morte prematura associada à má formação óssea (RATH *et al.*, 2000; COOK, 2000; BARBOSA *et al.*, 2010) é a consequência mais drástica. No entanto, fatores como ganho de peso, níveis de contaminação nos abatedouros e o bem estar animal também são consideravelmente afetados pelos problemas locomotores (POWELL e BITTAR, 2008).

Ações para reduzir as perdas relacionadas a estes problemas já vem sendo desenvolvidas. Mudanças na dieta nutricional nas diferentes etapas de desenvolvimento do frango, suplementação alimentar (EDWARDS, 2000; ZHOU *et al.*, 2007) e treinamento aos funcionários que realizam a captura e transporte das aves adultas até os abatedouros são algumas das medidas usadas para reduzir estes problemas (LUDTKE, 2008). Uma maior atenção por parte das empresas de melhoramento genético é outra importante medida que está sendo empregada (COOK, 2000; MARTINEZ-CUMMER *et al.*, 2006).

Especificamente no que diz respeito ao melhoramento genético de aves, técnicas tradicionalmente empregadas no melhoramento clássico têm sido usadas na tentativa de selecionar frangos de crescimento rápido, mas que sejam menos propensos ao desenvolvimento de anomalias ósseas (KNOWLES E WILKINS, 1998).

Mais recentemente vem sendo estudado o uso de técnicas de biologia molecular, em especial o uso de marcadores moleculares para o desenvolvimento de processos de seleção mais rápidos e eficientes. Marcadores do tipo SNP, do inglês “polimorfismo em um único nucleotídeo”, representam a última geração de marcadores, e seu emprego no melhoramento genético já é uma realidade para diferentes espécies animais (GARCIA, 2006; CAETANO, 2009). Os SNPs podem ser encontrados tanto em regiões promotoras, de éxons, íntrons assim como em regiões inter gênicas. Por esta razão são excelentes marcadores, uma vez que permitem cobrir todo o genoma do indivíduo.

No Brasil, a Embrapa Suínos e Aves juntamente com seus parceiros, é uma das instituições pioneiras na pesquisa de genômica com aves. Diversos estudos

usando marcadores microssatélites para identificar e mapear QTLs (loci para características quantitativas) associados a características de interesse econômico (MOURA *et al.*, 2006; ROSÁRIO *et al.*, 2006; BOSCHIEIRO *et al.*, 2007; RUY *et al.*, 2007), análise genômica funcional para características de produção e qualidade da carne (ALVES *et al.*, 2005; ANDREOTE *et al.*, 2006) assim como a validação de marcadores potenciais em frangos de corte, especialmente do tipo SNP (PEIXOTO *et al.*, 2008, LEDUR *et al.*, 2011a) destacam a relevância das informações genômicas como parte essencial para os programas de melhoramento atuais e futuros.

O trabalho desta dissertação foi desenvolvido em parceria com a Embrapa Suínos e Aves, localizada em Concórdia, estado de Santa Catarina, e o programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. O projeto no qual as atividades foram realizadas é liderado pela pesquisadora Jane de Oliveira Peixoto. Os procedimentos experimentais conduzidos nos laboratórios do “Complexo de Laboratórios em Sanidade e Genética Animal” e no “Laboratório de Análises Físico-Químicas” da Embrapa Suínos e Aves, foi orientado pela professora Dr.^a Vanete Thomaz Soccol e co orientado pelas pesquisadoras Dr.^a Jane de Oliveira Peixoto e Dr.^a Mônica Correa Ledur.

O conteúdo do trabalho foi dividido em dois capítulos. No capítulo “Sequenciamento e descoberta de polimorfismos em genes relacionados à integridade óssea em linhas puras de aves” foram analisados e descritos os polimorfismos identificados nos fragmentos amplificados de sete diferentes genes. Já no capítulo “Identificação de marcadores nos genes *opg* e *ibsp* e seus efeitos sobre características de desempenho, carcaça e estrutura óssea em uma linhagem paterna de frangos de corte” dois SNPs foram selecionados, genotipados e avaliados seus efeitos sobre características que estão direta e indiretamente associadas ao desenvolvimento da estrutura óssea de aves.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a associação entre polimorfismos do tipo SNP em dois dos sete genes candidatos calbidina, fator de transcrição “*runt related*”, osteopontina, osteoprotegerina, proteína morfogenética óssea, sialoproteína óssea e sosteopontina, e a integridade óssea em uma linhagem paterna de frangos de corte.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I:

- ⇒ Sequenciar fragmentos dos genes em estudo, em dez aves da linhagem de corte (TT) e cinco aves da linhagem de postura (CC).
- ⇒ Analisar sequências e identificar polimorfismos do tipo SNP nos fragmentos sequenciados.

Capítulo II:

- ⇒ Genotipar dois SNPs pela técnica de PCR-RFLP em 510 aves da população referência TT.
- ⇒ Avaliar características físicas, mecânicas e de composição química dos ossos tíbia e fêmur na população referência TT.
- ⇒ Analisar a estatística da associação genótipo e o fenótipo.
- ⇒ Identificar marcadores moleculares associados a características envolvidas com a estrutura óssea em aves da população referência TT.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. PRODUÇÃO AVÍCOLA

3.1.1. Panorama mundial

A produção avícola é um exemplo de atividade promissora e de sucesso, não somente no Brasil como em outras partes do mundo. O consumo e produção de carne de frango vêm aumentando consideravelmente nas últimas décadas, e representa a segunda fonte de proteína animal mais consumida no mundo, atrás somente da carne suína (TALAMINI *et al.*, 2006).

Estados Unidos, China, Brasil e União Européia são os quatro maiores produtores e centros consumidores de carne de frango. O Brasil ocupa a posição de terceiro maior produtor, quarto maior consumidor e primeiro exportador mundial deste tipo de produto (MENDES, 2010).

Segundo o Sebrae (2008) entre os anos de 1990 e 2004 a produção brasileira teve aumento de cerca de 50% no volume total de produção, enquanto outros grandes centros produtores como a China e Estados Unidos tiveram aumento de aproximadamente 15% no mesmo período.

No ano de 2005 a produção brasileira chegou à marca histórica de 9,2 milhões de toneladas. Neste mesmo ano as produções americana, chinesa e européia foram de 15,8; 10,2 e 7,7 milhões de toneladas respectivamente (ABEF, 2010).

Entre os quatro maiores produtores apenas a União Européia registrou saldo negativo na produção quando avaliado o volume produzido no período de 2001 a 2005. Segundo Talamini *et al.* (2006), com base em dados do USDA¹, neste mesmo período, Brasil, China e Estados Unidos apresentaram aumento médio de 38,3; 12,5 e 9,9%, respectivamente, enquanto que a União Européia teve redução de 2,7% em sua produção. Esta redução no bloco Europeu se deve ao cumprimento de metas negociadas com a Organização Mundial do Comércio para redução de subsídios e tarifas impostas a importação de carne de frango nos países membros do bloco.

¹ USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

Entre os principais importadores de carne de frango estão Rússia, Japão e União Européia. No ano de 2006 o maior importador mundial de carne de frango foi à Rússia com 1,22 milhões de toneladas, seguido pelo Japão e União Européia, com 0,696 e 0,640 milhões de toneladas respectivamente. Já os maiores exportadores no ano de 2006 foram o Brasil com 2,922 milhões de toneladas, seguido pelos Estados Unidos com 2,618 milhões toneladas e União Européia com 0,623 milhões de toneladas exportadas (RODIGHERI, 2008).

Apesar de ter seu desempenho afetado em razão da gripe aviária e recessão mundial, a produção de carne de frango deve voltar a seguir uma tendência de expansão. Projeções revelam que o consumo per capita de carne de frango nos Estados Unidos deve aumentar de 86,6 pounds²/ per capita no ano de 2006 para 96,8 pounds/per capita em 2015. Por outro lado, o consumo per capita americano de carne suína e bovina neste mesmo período deverá cair de 50 para 49,9 pounds/ per capita e de 67,7 para 64,8 pounds/ per capita, respectivamente. (USDA, 2006).

Mesmo com a provável recuperação de importantes mercados consumidores, como o americano e europeu, previsões revelam que o crescimento no mercado avícola será sustentado principalmente pelo aumento no consumo de países emergentes com destaque para a China (SEBRAE, 2008).

3.1.2. Panorama nacional

A avicultura nacional é um dos setores do agronegócio brasileiro mais bem organizados. Exemplo de sucesso e vitalidade, este segmento contribui de maneira considerável para a geração de empregos, divisas e riquezas.

Mesmo tendo iniciado sua produção em larga escala em meados da década de 70, o Brasil representa atualmente um dos principais exportadores de carne de frangos e derivados. Esta posição é resultado do árduo trabalho desenvolvido pelos diferentes segmentos envolvidos na cadeia avícola, por meio de um planejamento integrado, cooperação e organização (TALAMINI *et al.*, 2006; MENDES, 2010).

A região sul é destaque, concentrando boa parte da produção nacional. O estado do Paraná, seguido por Santa Catarina e Rio Grande do Sul são os três

² Pounds – Medida inglesa de massa. Um pound equivale a aproximadamente 0.45359237 Kg. Fonte: Site Pounds to Kilos. Disponível em: <http://www.poundstokilos.com/>

maiores produtores. Já com relação às exportações o estado de Santa Catarina está na liderança, seguido pelo Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo respectivamente (ABEF, 2010). A Figura 1 mostra a distribuição percentual dos principais estados exportadores de carne de frango no ano de 2009.

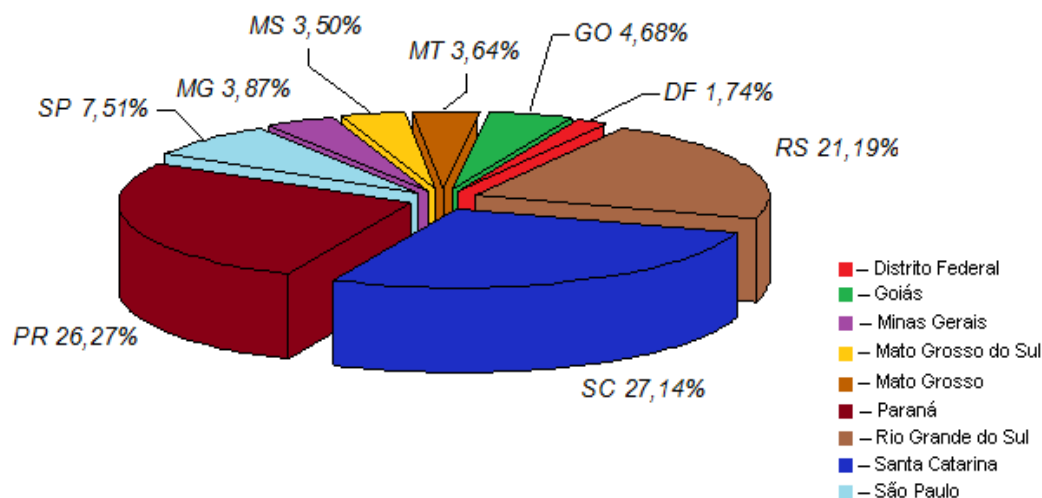


FIGURA 1 – Desempenho (em porcentagem) dos principais estados brasileiros exportadores de carne de frango no ano de 2009. Fonte: Modificado ABEF (2010)

Apesar de a produção estar concentrada no sul e sudeste, existe uma tendência de aumento gradual em outras regiões, especialmente a região centro-oeste que possui grandes produções de milho e soja, principais itens para a alimentação das aves (RODIGHERI, 2008).

Segundo o informativo divulgado no portal agronegócio em 11/05/2010 o estado do Paraná atingiu no primeiro trimestre de 2010 recorde histórico em sua produção, chegando à marca de 207.116,193 frangos abatidos. Isto corresponde a um aumento de 10% em relação ao primeiro trimestre de 2009, e o maior número que o estado atingiu nos últimos anos.

Embora o comércio avícola brasileiro tenha sido “ameaçado” por barreiras sanitárias e o estabelecimento de cotas por alguns países, tais como a Rússia, o Brasil tem conseguido manter seus níveis de produção aproximadamente estáveis com projeção de expansão gradual para os próximos anos. O aumento do consumo interno aliado à busca por novos mercados consumidores permitiram que o Brasil conseguisse manter seus níveis de produção, ao contrário do que ocorre em alguns

de seus concorrentes. Enquanto que em 2000 a carne de frango brasileira era exportada para 72 países, em 2005 este número aumentou para 172 países, permitindo ao Brasil diversificar seu mercado consumidor (SEBRAE, 2008).

A venda de produtos com maior valor agregado é outra tendência que fortalece o mercado avícola nacional. Desde 2001 a comercialização de cortes tem superado a de frangos inteiros. A venda de produtos industrializados também tem aumentado, embora de maneira mais modesta (Figura 2).

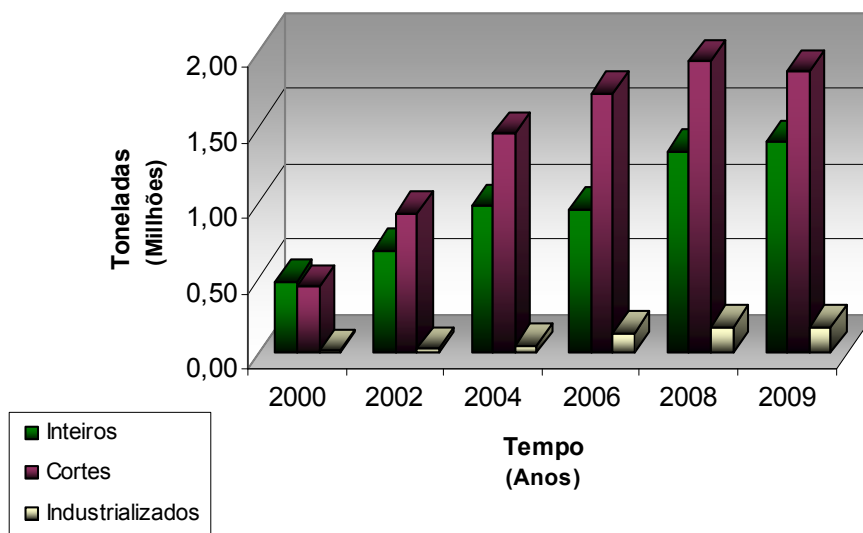


FIGURA 2 – Exportações de carne de frango por segmento. Fonte: Modificado ABEF (2010)

Segundo Mendes (2010) de 1999 para 2009 a produção e exportação passaram de 2,267 e 0,299 para 10,959 e 3,594 milhões de toneladas respectivamente. Neste mesmo período o consumo interno passou de 4,756 milhões de toneladas para 7,365 milhões de toneladas em 2009. De acordo com Talamini *et al.* (2006) o consumo brasileiro de carne de frango passou de 4 Kg/ per capita em meados da década de 70 para cerca de 35 Kg/ per capita em 2005. Já no ano de 2009 o consumo atingiu a marca de 38,1 Kg/ per capita (MENDES, 2010).

Estima-se que o consumo continuará aumentando nos próximos anos, acompanhando a renda familiar (ROPPE, 2008). Da mesma forma, a demanda por alimentos industrializados prontos, semi preparados, assim como por alimentos

funcionais³ ou alicamentos deverá se expandir atingindo um maior número de consumidores (SEBRAE, 2008).

O aumento do consumo interno, aliado a uma provável amenização da crise econômica mundial, e retomada das exportações deverá consolidar o Brasil como o maior exportador mundial de carne de frango. Contribuindo para este cenário, os custos produtivos devem manter-se estáveis, com boa oferta de milho e farelo de soja (COGO, 2010).

Projeções citadas por Mendes (2010) com base em dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento relevam perspectivas de uma taxa de crescimento média em torno de 3,6% a.a de 2008 a 2020. No entanto, é preciso salientar que investimentos destinados ao controle sanitário, manejo animal, fiscalização, melhoramento genético e desenvolvimento de novos produtos são essenciais para que os níveis de produção mantenham-se em constante elevação, e a avicultura brasileira mantenha-se competitiva e produtiva.

3.2. MELHORAMENTO GENÉTICO DE AVES

3.2.1. Histórico

O melhoramento genético animal não é uma atividade nova. Mesmo antes dos primeiros fundamentos a cerca da genética moderna, o homem já usava métodos de seleção com base no fenótipo reforçado por informações ou relações entre os indivíduos, para selecionar os que apresentassem características de maior interesse. No caso dos frangos, a aplicação dos processos de melhoramento se iniciou a partir da domesticação da galinha ainda nos tempos neolíticos, a cerca de 7.000 a.C. (SIEGEL *et al.*, 2006).

Fundamentalmente o melhorista se preocupa em estimar e estudar as relações que envolvem a natureza e magnitude das diferenças ambientais, genóticas e fenotípicas (BOWMAN, 1981). Para isso, os programas de melhoramento necessitam de um constante acompanhamento, em que os critérios

³ Alimentos Funcionais – De acordo com a portaria nº 398 de 30/04/99, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, alimentos funcionais correspondem a “todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ ou fisiológicos e/ ou efeitos benéficos á saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.

de seleção estabelecidos garantam a renovação dos plantéis com potencial genético superior em relação à geração anterior (VIANNA, 2000). Informações confiáveis acerca de parâmetros genéticos (herdabilidade e correlações genéticas) e fenotípicos (correlações fenotípicas) são fundamentais para definir os corretos critérios de seleção (VAYEGO *et al.*, 2008).

No Brasil, desde a década de quarenta se discutia a necessidade de implantar sistemas de melhoramento animal, em especial o melhoramento de aves. Mas foi somente em meados da década de cinquenta, por meio do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuária do Centro Sul que estas ações tiveram seu início. No final da década de setenta e início de oitenta, o melhoramento genético de aves conseguiu se expandir, com destaque para as seguintes instituições de pesquisa: ESALQ/USP, UFV, Instituto de Zootecnia, localizado em Nova Odessa, Universidade Federal de Santa Maria e Embrapa (SILVA, 2009).

Atualmente, algumas instituições públicas ainda desenvolvem trabalhos em genética de aves e desenvolvimento de linhagens, com maior ou menor complexidade dependendo de suas respectivas infra-estruturas. Apesar disso, a maioria dos programas nacionais de melhoramento genético fracassou ou foi adquirido por grupos multinacionais. Diante deste cenário, a Embrapa Suínos e Aves tem desenvolvido esforços no sentido de implementar uma nova visão na genética de aves nacional, com parcerias que envolvam o setor público e a iniciativa privada para o desenvolvimento de recursos genéticos destinados a atender as necessidades do mercado brasileiro (LEDUR *et al.*, 2011b).

3.2.2. Benefícios do melhoramento

O avanço nos conhecimentos e técnicas da genética avícola permitiu progressos em diferentes áreas, que vão desde as diretamente ligadas à produção e reprodução, até aquelas que se beneficiaram de algum modo dos resultados e descobertas de pesquisas científicas avícolas (SIEGEL *et al.*, 2006).

Nas últimas décadas têm se observado um considerável avanço no melhoramento de linhagens de frangos. Em 1930, por exemplo, eram necessários 3,50 Kg de ração para o ganho de 1 Kg de frango, hoje este valor não passa de 1,75 Kg. Estas melhorias permitiram também uma redução considerável no período até o

abate, que era de 15 semanas em 1930 para apenas 41 dias nos dias atuais (MENDES, 2010).

Ao longo dos anos os processos de seleção estão se baseando cada vez mais nas descobertas científicas e no uso de tecnologias avançadas, como a genômica e a tecnologia da informação (ALBERS *et al.*, 2008). Como resultado, o atual mercado de genética avícola é controlado por pequeno número de empresas, que mesmo frente às elevadas exigências a qual são submetidas por parte do setor produtivo, tornam o melhoramento genético de aves no Brasil, uma atividade controlada por apenas algumas corporações multinacionais (ALBERS *et al.*, 2008; SILVA, 2009).

As linhagens de aves atualmente comercializadas possuem potenciais genéticos diferentes, como resultado da pressão de seleção a que são submetidas com o propósito de intensificar o desenvolvimento de características econômicas baseadas no comportamento e exigências do mercado avícola (VIANNA *et al.*, 2000).

Além disso, empresas que tem ênfase na comercialização de aves inteiras têm prioridades distintas das que comercializam aves em cortes, de forma que as características genéticas reforçam ainda mais a escolha da marca comercial a ser usada na produção (ARAÚJO *et al.*, 2002). No caso de linhagens de corte, processos de melhoramento genético realizados nas últimas décadas, priorizam linhagens que produzissem com baixo teor de gordura, carcaça de boa qualidade, em um curto período de tempo e com o menor custo possível (VIANNA *et al.*, 2000).

3.2.3. Desafios a serem vencidos

Apesar de décadas de melhoramento, algumas características precisam de atenção constante à medida que se selecionam aves com melhor conversão alimentar e de crescimento rápido; das quais se destacam: dedos e pernas retas, cor e textura da carne além de uma maior resistência de pernas e esqueleto (LUBRITZ, 2008).

Temas relacionados ao bem estar animal, poluição ambiental, biodiversidade e sustentabilidade dos sistemas de produção deixaram de ser preocupação apenas de grupos ambientalistas, e hoje representam uma preocupação global que envolve indústrias, governos e a sociedade como um todo. O bem estar animal em especial,

tem grande impacto sobre o melhoramento genético. Por isso acredita-se que os futuros programas de melhoramento devam dar menos ênfase a características relacionadas ao crescimento e mais ênfase as relacionadas ao bem estar e a uma maior eficiência e rendimento (ALBERS *et al.*, 2008).

Novas técnicas e procedimentos estão sendo gradualmente incorporados aos tradicionais métodos, como as descobertas em biotecnologia e as novas gerações de computadores com elevada capacidade de manipulação de dados e informações. Mesmo assim, é preciso destacar que a criação de frangos está longe de ser uma ciência exata, visto que inúmeras são as variáveis que interferem nos processos de melhoramento (SIEGEL *et al.*, 2006; LUBRITZ, 2008).

Assim, é essencial que todo o melhoramento seja feito de maneira integrada, por meio de uma seleção equilibrada e cuidadosa para várias características (LEDUR *et al.*, 2011a). Priorizar excessivamente algumas características em detrimento de outras pode levar a consequências futuras indesejáveis.

A elevada taxa de crescimento das aves comerciais conseguida nas últimas décadas, por exemplo, produziu frangos que atingem o peso de abate em um curto intervalo de tempo. Por outro lado frangos de corte com crescimento muito rápido podem desenvolver anomalias reprodutivas que elevam o número de ovos impróprios para incubação, problemas cardiorrespiratórios que podem levar a morte prematura além de deformidades nas pernas e carcaça (VIANNA *et al.*, 2000).

3.3. TECIDO ÓSSEO

3.3.1. Estrutura óssea

O tecido ósseo era visto como uma estrutura estática, que possuía apenas a função de fornecer suporte ao corpo do animal. No entanto hoje sabe-se que este tecido possui inúmeras funções, não se limitando somente as que envolvam a resistência mecânica e ao suporte corporal. O osso é constituído por vasos sanguíneos e nervos, e tem a capacidade de regenerar-se quando sofre alguma lesão ou for atingido por alguma patologia (BARBOSA, 2005).

Os ossos são constituídos por aproximadamente 70% de minerais, 20 % de matriz orgânica e 10% de água. O colágeno é o maior constituinte da matriz orgânica, e confere resistência à tração. Já os sais cristalinos depositados na matriz

óssea constituídos principalmente de cálcio e fosfato, se combinam para formar cristais de hidroxiapatita que são os responsáveis por fornecer resistência à compressão (RATH, 2000).

Nos organismos em crescimento, as extremidades dos ossos longos são chamadas de epífises, enquanto que o eixo do osso localizado entre as epífises é conhecido como diáfise. Com exceção da cartilagem que recobre as extremidades, os ossos são revestidos por uma membrana de tecido conjuntivo chamada de perióstio. Esta possui duas camadas, a primeira densa e fibrosa, que confere certa resistência aos impactos, e a outra mais interna e vascular (FRANDSON *et al.*, 2005).

Macroscopicamente existem dois tipos de ossos, o trabecular (esponjoso) constituído por uma estrutura com aspecto esponjoso, e o cortical (compacto), (Figura 3) mais sólido e formado por lamelas ósseas (VIEIRA, 1999).

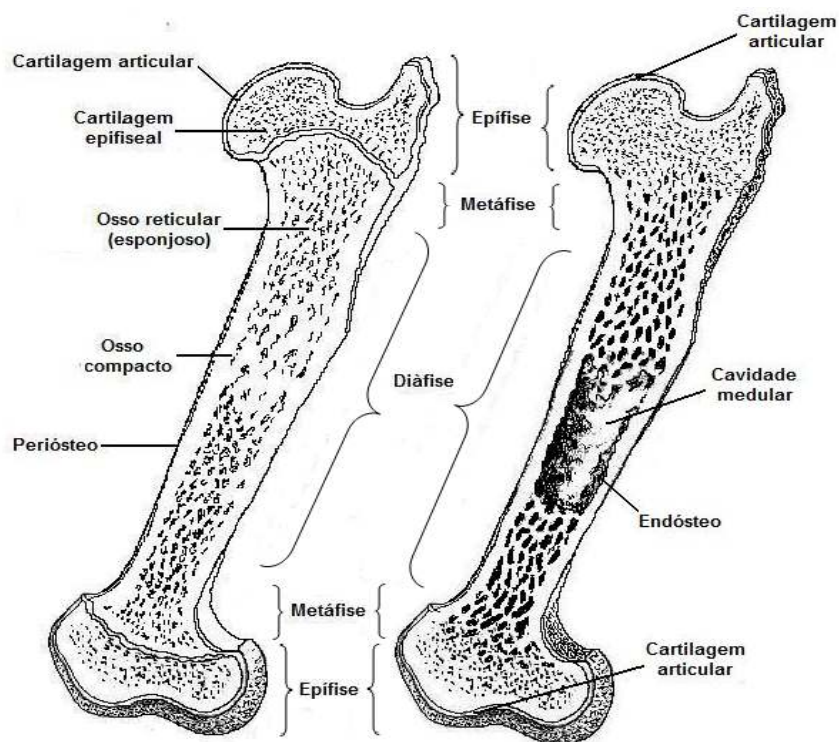


FIGURA 3 – Secção longitudinal do fêmur. Esquerdo: Imaturo (placas de crescimento abertas). Direito: Maduro (placas de crescimento fundidas). Fonte: Modificado Frandson (2005)

O osso do tipo trabecular possui amplos espaços ósseos e intercomunicantes formando uma rede chamada de trabéculas, que abrigam a

medula óssea onde ocorre a produção de células sanguíneas a partir de células mesenquimais (ANDIA *et al.*, 2006). Já no osso do tipo compacto, a matriz de colágeno está organizada em lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central, constituindo o sistema Havers. Os canais centrais, compostos de vasos sanguíneos e nervos se comunicam com a região medular e entre si, através dos canais de Volkmann (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Outros aspectos diferenciam estes dois tipos de ossos, como os relacionados à densidade da matriz mineralizada, distribuição das células e vasos sanguíneos e quanto à área ocupada pela medula óssea (VIEIRA, 1999). Estas diferenças além de estruturais também são funcionais. Enquanto que o osso compacto dá resistência e proteção, o esponjoso atua nas funções metabólicas (MARX e GARG, 1998).

Sendo um tecido multifuncional, metabolicamente ativo e constituído por um conjunto de células heterogêneas em diferentes estágios de diferenciação, os ossos possuem inúmeras funções que vão desde as de locomoção, suporte corporal e proteção dos órgãos, até as respostas fisiológicas, como as de produção de elementos do sangue e reserva metabólica de minerais como o cálcio e o fósforo (BARBOSA, 2005).

Existem diferentes células responsáveis pelo desenvolvimento da estrutura óssea. Destacam-se as células-tronco mesenquimais, recrutadas para o desenvolvimento e expansão do tecido ósseo, condrócitos que são uma linhagem de células responsáveis pelo desenvolvimento e crescimento dos ossos longos, osteoblastos que sintetizam a matriz óssea, osteócitos que atuam na mineralização da matriz óssea fornecendo proteção às células que revestem a superfície e os osteoclastos, que são os responsáveis pela reabsorção dos tecidos calcificados (LIAN e STEIN, 2006).

3.3.2. Anomalias ósseas em aves

Muito se tem feito para caracterizar e identificar as causas das deformidades ósseas em aves, mesmo assim tais problemas continuam causando perdas às indústrias avícolas (COOK, 2000).

Pesquisa conduzida no ano de 1993 nos Estados Unidos estimou perdas anuais decorrentes de problemas ósseos entre 80 a 120 milhões de dólares/ ano.

Ainda, segundo esta pesquisa, o descarte de carcaças foi de aproximadamente 3,2%. Deste total, 1,1% e 2,1% resultaram em descarte por morte prematura e condenação de carcaça, respectivamente (SULLIVAN, 1994).

Já Yogaratnam (1995) ao avaliar as principais causas de condenação de carcaça em aves, observou que uma porcentagem significativa (19,5%) apresentava definhamento. Muito provavelmente esta consequência é resultado de problemas locomotores que contribuem no aparecimento de lesões de pele e articulações.

O melhoramento genético de aves de corte tem proporcionado um rápido crescimento em um curto intervalo de tempo. Em aproximadamente 41 dias uma ave destinada à produção de carne, atinge o peso médio para o abate de 2,4 Kg (SEBRAE, 2008). Por outro lado, este rápido crescimento produziu alguns problemas, particularmente os associados ao precário desenvolvimento do tecido ósseo e ao sistema cardiorrespiratório (JULIAN, 1998).

No que diz respeito aos problemas ósseos, a degeneração tumoral juntamente com a discondroplasia tibial são as principais anomalias associadas às perdas ocasionadas por problemas do tecido ósseo em frangos de corte. Os problemas de locomoção levam a perdas econômicas, pelo descarte ou a desclassificação de carcaças em abatedouros, especialmente devido a lesões, fraturas e hematomas. Também se observam quedas no desempenho por retardo no crescimento das aves com problemas de locomoção, tornando-se mais leves e frágeis, e consequentemente apresentando piores resultados zootécnicos (PAZ, 2008).

O funcionamento dos equipamentos que realizam a desossa e evisceração também pode ser afetado por aves que apresentem deformidades ósseas, alterando o fluxo das linhas de produção e levando a necessidade de que tais atividades sejam feitas de forma manual. Além disso, aves mancas podem aumentar os níveis de contaminação nos abatedouros, o que representa um aumento dos riscos à segurança dos alimentos (POWELL e BITTAR, 2008).

O aumento na ocorrência de fragmentos ósseos na carne processada parece ser resultado da baixa integridade óssea. Mudanças no aspecto sensorial tornam os produtos menos atrativos, com menor capacidade de comercialização e menor percentual de lucros (BARBOSA, 2005).

Outro fator importante, e que é diretamente afetado por problemas locomotores, diz respeito ao bem estar animal. Este assunto deixou de ser somente

um tema dos grupos que defendem os direitos dos animais, e passou a ser uma discussão mundial (LUDTKE *et al.* 2008). Aves com problemas locomotores ficam privadas de pelo menos três das cinco liberdades que representam o alicerce do bem estar animal, a saber: liberdade fisiológica, ambiental, sanitária, psicológica e comportamental (PAZ, 2008).

Embora não existam normas plenamente reconhecidas a nível mundial, observa-se uma forte tendência de que ações que levem a melhores condições para os animais ganhem gradual apoio, podendo tornar se barreiras comerciais aos países que não as apliquem em seus processos produtivos (LUDTKE *et al.*, 2008).

Como resultado da crescente preocupação com as questões relacionadas ao bem estar animal na última década, as empresas de melhoramento genético estão abordando o assunto com maior atenção. Considerando os prejuízos que a má formação óssea ou mesmo o baixo desenvolvimento do tecido ósseo ocasionam para a avicultura, as empresas de melhoramento genético tendem a tomar medidas para sanar estes problemas (POWELL e BITTAR, 2008).

3.4. BIOTECNOLOGIA APLICADA AO MELHORAMENTO DE AVES

3.4.1. Genômica avícola

Os tradicionais métodos de melhoramento têm permitido avanços nos ganhos genéticos em linhagens comerciais de aves por décadas. Nesse processo, por meio da genética quantitativa, uma série de características como peso vivo, conversão alimentar, fertilidade, capacidade de locomoção, número de ovos entre outras são mensuradas. As informações de cada indivíduo, assim como de seus parentais, são usadas para que valores genéticos sejam estimados pelo uso de modelos estatísticos baseados no pedigree disponível para cada família (JEGO, 2008).

Apesar dos avanços obtidos pelo uso de tais metodologias, que se diga de passagem, foram muito significativos, a atual genética de aves requer técnicas mais precisas e que proporcionem melhorias significativas para características específicas baseadas nas necessidades do mercado (ALBERS *et al.*, 2008).

Descobertas recentes no campo da biotecnologia têm estimulado o estudo e investigação de novas técnicas e processos. A partir disso, a genética molecular tem

se tornado uma atrativa fonte de pesquisa para a descoberta de elementos que proporcionem ganhos significativos em características de interesse comercial (COUTINHO *et al.*, 2010).

O conhecimento das informações genéticas de um animal permite que seu potencial possa ser estimado mesmo antes da expressão do seu fenótipo, tornando-se um poderoso instrumento para o melhoramento (BEUZEN *et al.*, 2000). A galinha é um animal eucarionte, cujo tamanho do genoma é estimado em $1,2 \times 10^9$ pares de base (EMARA *et al.*, 2003) ou cerca de 3.228 cM (GROENEN *et al.*, 2009). Compreende 39 pares de cromossomos. Destes, 30 pares são de microcromossomos, um par de cromossomos sexuais e oito pares de macro cromossomos (EMARA e KIM, 2003).

O sequenciamento do genoma da galinha abriu novas perspectivas no uso da genética aplicada ao melhoramento. A cada dia, novas informações provenientes de diferentes centros de pesquisa, enriquecem os bancos de informações a cerca do genoma da galinha, assim como de outros animais.

O grande desafio para o melhoramento genético de aves neste momento está em usar estes dados e informações de maneira inteligente na seleção de aves com grande potencial comercial.

Pesquisas procurando identificar loci que influenciam características quantitativas (QTL) através de análises em genes candidatos e o mapeamento do genoma com marcadores moleculares, tem se apresentado como interessantes alternativas para o uso prático das informações oriundas dos estudos em genômica. Como resultado, espera se que a seleção assistida por marcadores ou genes, seja uma realidade nos futuros programas de melhoramento de aves (LEDUR, 2004).

3.4.2. Marcadores moleculares

Marcadores moleculares de DNA são por definição marcadores capazes de detectar polimorfismos que ocorrem ao nível do DNA (BEUZEN *et al.*, 2000). Ao se analisar o comportamento do marcador molecular em uma população, segundo as leis de herança de Mendel, o marcador molecular é adicionalmente definido como marcador genético (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os primeiros trabalhos que fizeram uso de marcadores moleculares em animais de interesse zootécnico datam do início da década de 80. Caracterizavam-

se por estudos trabalhosos e inovadores para a época. Na década seguinte, estudos envolvendo o uso de marcadores moleculares em suínos, bovinos e equinos passaram a ser realizados em maior número, o que tornou possível o desenvolvimento dos primeiros mapas genéticos para espécies de interesse zootécnico (CAETANO, 2009).

Os principais marcadores descritos são as inserções e deleções (Indels), os polimorfismos de uma única base (SNP) e as regiões repetidas (microssatélites). Estes marcadores podem ocorrer em regiões codificantes e promover alterações na sequência de aminoácidos da proteína, sendo nestes casos, chamados de polimorfismos não sinônimos. Já quando ocorrem em regiões codificadoras, e que não levem a alterações no aminoácido da sequência protéica, ou quando ocorrem em regiões não codificadoras, são então, chamados de polimorfismos sinônimos (GARCIA, 2006).

3.4.3. Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)

Os marcadores SNP, sigla em inglês para *Single Nucleotide Polymorphism*, ou polimorfismo de nucleotídeo único, se caracterizam por envolverem a substituição de um nucleotídeo (BEUZEN *et al.*, 2000). As mutações mais frequentes são as transições que envolvem a troca de uma purina por outra purina (adenina por guanina ou vice versa) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (citosina por timina ou vice versa). Transversões também ocorrem, mas com uma menor frequência (CAETANO, 2009).

As bases moleculares dos SNPs os tornam excelentes marcadores. Algumas razões para o crescente uso dos SNPs em análises genéticas envolvem o fato de serem encontrados em abundância e distribuídos ao longo de todo o genoma. Outra justificativa importante é que podem ocorrer tanto em regiões codificadoras (éxons), íntrons assim como em regiões intergênicas (GUIMARÃES e COSTA, 2002). Em todos os casos com uma maior frequência se comparado aos marcadores microssatélite e Indels (BEUZEN, 2000).

Os SNPs são em geral bi-alélicos, e sua ocorrência em regiões regulatórias e codificadoras podem produzir diferenças na função protéica e por consequência alterações no fenótipo. Mudanças nas regiões não codificadoras também podem

alterar a expressão genética por fatores como a promoção de processamentos alternativos do mRNA (GARCIA, 2006).

Atualmente a identificação de SNPs pode ser feita de diferentes maneiras. Uma metodologia em particular, envolve a abordagem pela técnica de PCR-RFLP para a sondagem de SNPs em uma região específica no genoma (CAIXETA *et al.*, 2006). Esta técnica corresponde ao método mais básico para a identificação de SNPs, e envolve o sequenciamento direto dos fragmentos de interesse, alinhamento e comparação entre as sequências (CAETANO, 2009).

Entretanto com o desenvolvimento tecnológico, novas metodologias têm surgido. As chamadas tecnologias de sequenciamento de segunda geração baseadas em microarranjos de DNA, aliadas a novos programas para análise de dados, tem tornado possível a genotipagem em massa, em um curto intervalo de tempo e a custos reduzidos (MELDRUM, 2000). Outras duas metodologias que podem ser empregadas para a análise de SNPs são a espectrometria de massa e a cromatografia líquida de alta pressão desnaturante (DHPLC) (GUIMARÃES e COSTA, 2002).

O uso extensivo deste marcador pode ser confirmado pela variedade de aplicações descritas na literatura, entre as quais, para o mapeamento genético, rastreabilidade, identificação de polimorfismos associados a características de produção entre outras (CAETANO, 2009).

A identificação de SNPs em genes candidatos, por exemplo, pode ser uma poderosa ferramenta para o melhoramento genético de aves. O uso da tecnologia dos marcadores moleculares por meio da seleção assistida por marcadores (MAS) é vista como uma das melhores maneiras de incorporar os conhecimentos da genética molecular para a melhoria dos programas de melhoramento (LEDUR, 2004).

A seleção para características que tenham alto custo e que sejam de difícil medição ou que demandem abater as aves, tais como, resistência a doenças, qualidade da carne e para o bem estar animal poderão ser beneficiadas pelo uso da seleção assistida por marcadores (JEGO, 2008). Este tipo de abordagem também pode ser usado para a seleção de aves menos propensas a desenvolverem anomalias ósseas, por meio de genes candidatos.

3.5. GENES CANDIDATOS

Uma das alternativas utilizadas para a identificação de marcadores moleculares em programas de melhoramento é a abordagem do gene candidato, ou gene principal (GARCIA, 2006). Genes candidatos são por definição genes que possuem função biológica conhecida, e que estão de alguma maneira, envolvidos no desenvolvimento ou fisiologia de alguma característica (COUTINHO, 2010).

Embora a maior parte das características de interesse econômico seja de natureza quantitativa, e, portanto controladas por um *pool* de genes, acredita-se que existam certos genes que apresentem uma maior influência na expressão, sendo estes, chamados de genes principais (GARCIA, 2006).

Estes genes podem ter seus polimorfismos detectados, e caso estejam associados a características importantes, podem ser usados em programas de melhoramento genético. Um exemplo interessante de seu uso é o gene do halotano em suínos, que está associado à qualidade da carne (LEDUR, 2001).

Particularmente, no que diz respeito ao desenvolvimento do tecido ósseo, genes como a osteoprotegerina, sialoproteína óssea, osteopontina, calbidina entre outros, são descritos na literatura como atuantes em diferentes processos metabólicos envolvidos na ossificação. São, portanto, candidatos para a busca de SNPs que possam ser usados como marcadores moleculares para estas características.

3.5.1. Osteoprotegerina

A osteoprotegerina é uma proteína pertencente à superfamília dos receptores TNF (Fator de Necrose Tumoral) cujos efeitos mais notáveis parecem estar associados à inibição da reabsorção óssea. Esta é uma proteína altamente conservada ao longo da evolução, apresentando homologia de 94% entre ratos e camundongos, e de 89% entre camundongos e humanos (SAIDENBERG-KERMANAC'H *et al.* 2004).

Os membros representantes da superfamília TNF, consistem principalmente de proteínas transmembrânicas que atuam nos processos de transdução de sinais em uma variedade de células (SIMONET, *et al.* 1997). Ao nível celular, fatores de

crescimento e citocinas têm sido estabelecidos como efeitos no fenômeno que parece ter particular relevância na embriogênese (SANDERS *et al.* 1997).

A osteoprotegerina é uma proteína expressa pelos osteoblastos com um papel fundamental na regulação do metabolismo ósseo, atuando na inibição da diferenciação e ativação dos osteoclastos e no aumento da apoptose de osteoclastos (SAIDENBERG-KERMANAC'H *et al.* 2004).

Essa proteína foi identificada pela primeira vez pela homologia e possibilidade de ser um membro da superfamília TNF durante um projeto de sequenciamento em ratos. Inicialmente ela é sintetizada na forma de um monômero de aproximadamente 55kDa dentro da célula, em seguida convertida a um dímero de aproximadamente 110kDa (SIMONET, *et al.* 1997).

Atua regulando negativamente a ativação e o desenvolvimento dos osteoclastos, através do sequestro de seu ligante, o RANKL que estimula a ativação e sobrevivência dos osteoclastos. Estes efeitos ocorrem quando RANKL liga no receptor RANK, que está presente nos precursores do osteoclasto e osteoclastos maduros, traduzindo-se em efeitos no interior dos ossos. Embora expresso principalmente pelos osteoblastos, o RANKL é também expresso por outros tipos celulares especialmente pelos linfócitos T. Já a osteoprotegerina atua ligando-se especificamente e com alta afinidade ao RANKL, inibindo assim a reabsorção óssea (SAIDENBERG-KERMANAC'H *et al.* 2004).

3.5.2. Sialoproteína óssea

A sialoproteína óssea é uma glicoproteína ácida muito abundante nos ossos, sendo expressa em altos níveis nas áreas de formação e remodelação óssea (YANG *et al.*, 2010). É sintetizada por diferentes tipos de células ósseas, incluindo osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (KERR *et al.*, 1993). Também tem sido observada sua expressão em cartilagem, dentes e certos carcinomas, em especial os que predominantemente originam metástases em ossos, tumores de tireóide assim como neuroblastomas e inúmeros mielomas (WUTTKE *et al.*, 2001).

Durante a diferenciação dos osteoblastos a regulação desta proteína é aumentada juntamente com a mineralização óssea. Esta ação representa um dos primeiros indicadores da diferenciação dos osteoblastos e parece ser uma etapa crítica para a compreensão da formação óssea (ROCA *et al.*, 2005).

A sialoproteína óssea é uma das mais abundantes proteínas ósseas (YANG *et al.*, 2010) constituindo aproximadamente 15% das proteínas não colagenosas dos ossos (WUTTKE *et al.*, 2001). Muitas proteínas não colagenosas também estão associadas com a fase mineral dos ossos, e seu mau funcionamento associado à deficiência de cálcio ou de vitaminas pode levar a severas imperfeições ósseas (YANG *et al.*, 2010).

Em mamíferos, esta proteína possui perto de 327 aminoácidos com peso molecular em torno de 33-34 kDa. Inúmeras modificações pós traducionais, entre as quais fosforilação, sulfatação e glicosilação aumentam o peso molecular aparente para aproximadamente 75 kDa. O elevado número de resíduos de Glu (Glutamato) (aproximadamente 22% do total de aminoácidos), fosfatos e sulfatos fazem esta proteína possuir um caráter altamente ácido (YANG *et al.*, 2010).

Embora sua ação sobre os ossos e cartilagem ainda não seja completamente compreendida, acredita-se que ela tenha ação importante na ligação de osteoblastos e osteoclastos à matriz durante a remodelação óssea. Adicionalmente possui grande afinidade por hidroxiapatita, atuando como um “formador” de cristais de hidroxiapatita *in vitro*, e por esta razão é que parece estar envolvida nos processos de mineralização óssea (WUTTKE *et al.*, 2001).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF – Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos. **Relatórios Anuais ABEF**. São Paulo, 2010. Disponíveis em: <<http://www.abef.com.br/Estatisticas>>. Acesso em: 13/05/2010.

ALBERS, G. A.A.; SAMBEEK, F. M. J.P. V.; VENINGA, G. Tendências de Mercado e de Tecnologias em Genética Avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos, **Anais...** Campinas: FACTA, p.391-399, 2008.

ALVES, H. J., MARCHESIN, M. L., JORGE, E. C., SOARES, A. S., LEDUR, M. C., COUTINHO, L. L. Análise da expressão por RT-PCR em tempo real do gene Pax-3 em duas linhagens de aves (corte e postura). In: 51º Congresso Brasileiro de Genética - SBG. **Resumo...** Águas de Lindóia: SBG, p.325, 2005.

ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histopatológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.35, n.2, p.191-198, 2006.

ANDREOTE, A. P. D.; JORGE, E. C.; ALVES, H. J. LEDUR, M. C.; COUTINHO, L. L. Expressão diferencial de Syndecan-1 e RBAF600 associadas ao controle do desenvolvimento muscular. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética – SBG. In: 12º Congresso de la Asociación Latinoamericana de Genética. **Resumo...** Foz do Iguaçu, p.57, 2006.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos - Informe Técnico**, 1999. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home>> Acesso em: 21/02/2012.

APPLEGATE, T.J.; LILBURN, M.S. Growth of the Femur and Tibia of a Commercial Broiler Line. **Poultry Science**, v.81, p.1289-1294, 2002.

ARAÚJO, L. F.; JUNQUEIRA, O. M.; ARAÚJO, C. S. da S.; SAKOMURA, N. K.; ANDREOTTI, M. de O.; SUGUETA, S. M. Diferentes Perfis de Aminócidos para Frangos de Corte no Período de 43 a 56 Dias de Idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.387-393, 2002.

BARBOSA, A. A. **Aspectos químicos, bioquímicos, físicos e mecânicos de fêmures de frango de corte**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

BARBOSA, A. A.; MORAES, G. H. K.; TORRES, R. A.; REIS, D. T. C.; RODRIGUES, C. de S.; MULLER, E. S. Avaliação da qualidade óssea mediante parâmetros morfogenéticos, bioquímicos e biomecânicos em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.4, p.772-778, 2010.

BEUZEN, N. D.; STEAR, M. J.; CHANG, K. C. Molecular markers and their use in animal breeding – Review. **The Veterinary Journal**, v.160, n.1, p.42-52, 2000.

BOSCHIERO, C.; CAMPOS, R. L. R.; AMBO, M.; ROSARIO, M. F.; NONES, K.; LEDUR, M. C.; COUTINHO, L. L.; MOURA, A. S. A. M. T. Associações entre marcadores microssatélites do cromossomo 13 e características de desempenho, carcaça e órgãos em galinhas. 20º Congresso Latino-americano de Avicultura. **Memórias...** Porto Alegre, p.255-257, 2007.

BOWMAN, J.C. **Introdução ao melhoramento genético animal**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1981. 87p.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.64-71, 2009.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p. 9-78.

COGO, C. Especial: Perspectivas para 2010. **Artigo Técnico/Científico...** Carlos Cogo Consultoria Agroeconômica, 2010. Disponível em http://www.deere.com.br/pt_BR/ag/veja_mais/info_mercado/chicken.html>. Acessado em: 15/05/2010

COOK, M.E. Skeletal Deformities and Their Causes: Introduction. **Poultry Science**, v.79, p.982-984, 2000.

COUTINHO, L. L.; ROSARIO, M. F.; JORGE, E. C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, São Paulo, v.24, n.70, p.123-147, 2010. Disponível em : <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300009&lng=en&nrm=iso> Acessado em: 20/02/2011.

EMARA, M.G.; KIM, H. Genetic Markers and their Application in Poultry Breeding. **Poultry Science**, v.82, p.952-957, 2003.

EDWARDS, H.M. Jr. Nutrition and Skeletal Problems in Poultry. **Poultry Science**, v.79, p.1018-1023, 2000.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998, 220p.

FRANDSON, R.D.; WILKE, W. L.; DEE, A. **Anatomia e Fisiologia dos Animais da Fazenda**. 6. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005.160p.

GARCIA, J. F. Utilização de Marcadores Moleculares para a Seleção. In: 2º Simpósio de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, 2006. **Anais...** Londrina, p.195-201, 2006.

GAYA, L. G.; MOURÃO, G. B.; REZENDE, F. M.; MATTOS, E. C.; FILLHO, T. M.; FIGUEIREDO, G. G.; FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P. Genetic trends of abdominal fat content in a male broiler chicken line. **Genetics and Molecular Research**, v.4, n.4, p.760-764, 2005.

GROENEN, M. A. M.; WAHLBERG, P.; FOGGIO, M.; CHENG, H. H.; MEGENS, H. J.; CROOIJMANS, R. P. M. A.; BESNIER, F.; LATHROP, M.; MUIR, W. M.; WONG, G. K. S.; GUT, I.; ANDERSSON, L. A high-density SNP-based linkage map of the chicken genome reveals sequence features correlated with recombination rate. **Genome Research**, v.3, n.19, p.510-519, 2009.

GUIMARÃES, P. E. M.; COSTA, M. C. R. SNPs: sutis diferenças de um código. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.26, p.24-27, 2002

JEGO, Y. Perspectivas de Médio e Longo Prazo do Melhoramento Genético de Frangos de Corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos, **Anais...** Campinas: FACTA, 2008.

JULIAN, R.J. Rapid Growth Problems: Ascites and Skeletal Deformities in Broilers. **Poultry Science**, v.77, p.1773-1780, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 136-148p.

KERR, J. M.; FISHER, L. W.; TERMINE, J. D.; WANG, M. G.; McBRIDE, O. W.; YOUNG, M. F. The Human Bone Sialoprotein Gene (IBSP): Genomic Localization and Characterization. **Genomics**, v.17, p.408-415, 1993.

KNOWLES, T. G.; WILKINS, L. J. The Problem of Broken Bones During the Handling of Laying Hens – A Review. **Poultry Science**, v.77, p.1798-1802, 1998.

LIAN, J. B.; STEIN G. S. Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism. Chapter I4 – **The Cells of Bone**. New York: Academic Press, 2006.

LEDUR, M. C. Genoma do frango – Mapeamento de QTL. In: 38ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: 2001.

LEDUR, M. C. *et al.* A importância do conhecimento do genoma para a produção de aves. In: 41ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: 2004.

LEDUR, M. C.; NONES, K.; MOURA, A. S. A. M. T.; RIBEIRO, J. B.; COUTINHO, L. L. O Uso de Marcadores Moleculares na Produção de Aves. In: BRIDI, A. M.; FONSECA, A. N. A.; SILVA, C. A.; PINHEIRO, J. W. Zootec 2007 – A zootecnia frente a novos desafios. **Anais...** Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, p.457-482, 2007.

LEDUR, M. C.; PEIXOTO, J. O.; SCHIMIDT, G. S. Novos rumos da genética no desenvolvimento avícola. **Revista Avicultura Industrial**, v. 102, n. 1196, p.12-16, 2011a.

LEDUR, M. C.; FIGUEIREDO, E. A. P.; SCHMIDT, G. S.; AVILA, V. S.; PEIXOTO, J. O. O melhoramento genético de aves no Brasil e as contribuições da Embrapa Suínos e Aves. In: SOUZA, J. C. P. V. B., TALAMINI, D. J. D., SCHEUERMANN, G. N., SCHMIDT, G. S. **Sonhos, desafios e tecnologia: 35 anos de contribuições da Embrapa Suínos e Aves**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2011b. Cap. 11, p.293-316.

LUDTKE, C. B.; GREGORY, N.; DALLA COSTA, O. A. Principais Problemas e Soluções durante o Manejo Pré-Abate das Aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos, **Anais...** Campinas: FACTA, p.109-128, 2008.

LUBRITZ, D. Genética Avícola no Século XXI. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos, **Anais...** Campinas: FACTA, p.391-386, 2008.

MARTINEZ-CUMMER, M. A. HURTIG, M. LEESON, S. Use of Apparent Transverse Quantitative Ultrasonography to Assess Skeletal Integrity in Layers. **Poultry Science**, v.85, p.1648-1651, 2006.

MARX, R. E; GARG, A. K. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. **Implant Dentistry**, v.7, n.4, p.267-76, 1998.

MELDRUM, D. Automation for Genomics, Part Two: Sequencers, Microarrays, and Future Trends. **Genome Research**, v.10, p.1288-1303, 2000.

MENDES, A. A. Avicultura Brasileira: Avanços, Gargalos e Desafios. In: CONFERÊNCIA FACTA 2010 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2010, Santos, **Anais...** Santos: FACTA, p.123-138, 2010.

MOURA, A. S. A. M. T.; BOSCHIERO, C.; CAMPOS, R. L. R.; AMBO, M.; NONES, K.; LEDUR, M. C.; ROSARIO, M. F.; MELO, C. M. R.; BURT, D. W.; COUTINHO, L. L. Mapping QTL for performance and carcass traits in chicken chromosomes 6, 7, 8, 11 and 13. In: 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. **Resumo...** Belo Horizonte, p.211, 2006.

PAZ, I. C. L. A. Problemas Locomotores e Técnicas de Mensuração. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos, **Anais...** Campinas: FACTA, p.57-68, 2008.

PEIXOTO, J. O; JARDIM, S. N.; AMAZONAS, E. A.; ALVES, H. J.; COUTINHO, L. L.; LEDUR, M. C. Associação entre polimorfismo no gene da alfa actina e características produtivas em galinha. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2008, Santos, SP. **Anais...** Campinas: FACTA, 2008.

POWELL, K. C.; BITTAR, I. F. Atualidades em Problemas Locomotores em Frangos de Corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos, **Anais...** Campinas: FACTA, p.187-196, 2008.

RATH, N. C.; HUFF, G.R.; HUFF, W.F.; BALOG, J.M. Factors Regulating Bone Maturity and Strength in Poultry. **Poultry Science**, v.79, p.1024-1032, 2000.

ROCA, H.; PHIMPHILAI, M.; GOPALAKRISHNAN, R.; XIAO, G.; FRANCESCHI, R. Cooperative Interactions between RUNX2 and Homeodomain Protein-binding Sites Are Critical for the Osteoblast-specific Expression of the Bone Sialoprotein Gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.35, p.30845-30855, 2005.

RODIGHERI, J. A. Desempenho da Carne de Frango em 2007 e perspectivas para 2008. **Relatório - Epagri/Cepa, 2008.** Disponível em: <http://cepa.epagri.sc.gov.br/Informativos_agropecuarios/Carnes/Frango_07.08.08.pdf>. Acesso em: 25/04/2010

ROSÁRIO, M. F.; LEDUR, M. C.; MOURA, A. S. A. M. T.; COUTINHO, L. L.; GARCIA, A. A. F. Identificação de marcadores potencialmente associados à QTLs para características de rendimentos de carcaça em população experimental de galinhas. 43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia – SBZ. **Resumo Expandido...** João Pessoa, 2006.

ROPPE, L. Brasil: O consumo de carnes passando a limpo! In: Aveworld, 2008. **Artigo Técnico/Científico...** São Paulo, p.10-14, 2008.

RUY, D. C.; MOURA, A. S. A. M. T.; NONES, K.; BARON, E. E.; LEDUR, M. C.; CAMPOS, R. L. R.; AMBO, M.; MELO, C. M. R.; COUTINHO, L. L. Detection of QTL for performance, fatness and carcass traits on chicken chromosomes 3 and 5. In: 11th Workshop on QTL and Marker Assisted Selection – QTLMAS. **Abstracts...** Toulouse p.260-29, 2007.

SAIDENBERG-KERMANACH, N.; COHEN-SOLAL, M.; BESSIS, N.; DE VERNEJOU, M. C.; BOISSIER, M. C. Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation. **Joint Bone Spine**, v.71, p.9-13, 2004.

SANDERS, E.J.; WRIDE, M. A. Roles for Growth and Differentiation Factors in Avian Embryonic Development. **Poultry Science**, v.76, p.111-117, 1997.

SANTOS, A. L. Estudo do Crescimento, Desempenho, Rendimento de Carcaça e Qualidade de Carne de Três Linhagens de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.5, p.1589-1598, 2005.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Cadeia Produtiva da Avicultura – Cenários econômicos e estudos setoriais.** Recife, 2008. Disponível em <<http://200.249.132.89:8030/downloads/avicultura.pdf>>. Acessado em: 26/04/2010.

SIEGEL, P.B.; DODGSON, J.B.; ANDERSSON, L. Progress from Chicken Genetics to the Chicken Genome. **Poultry Science**, v.85, p.2050-2060, 2006.

SILVA, M. A. Evolução do melhoramento genético de aves no Brasil. **Revista Ceres**, v.56, n.3, p.437-445, 2009.

SIMONET, W. S.; LACEY, D.L.; DUNSTAN, C.R.; KELLY, M.; CHANG, M. S.; WOODEN, S.; BENNETT, L.; BOONE, T.; SHIMAMOTO, G.; DEROSE, M.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; TAN, H. L.; TRAIL, G.; SULLIVAN, J.; DAVY, E.; BUCAY, N.; RENSHAW-GEGG, L.; HUGHES, T. M.; HILL, D.; PATTISON, W.; CAMPBELL, P.; SANDER, S.; VAN, G.; TARPLEY, J.; DERBY, P.; LEE, R.; AMGEN EST PROGRAM, BOYLE, W. J. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. **Cell**, v.89, p.309-319, 1997.

STRINGHINI, J. H.; LABOISSIÈRE, M.; MURAMATSU, K.; LEANDRO, N. S. M.; CAFÉ, M. B. Avaliação do Desempenho e Rendimento de Carcaça de Quatro Linhagens de Frangos de Corte Criadas em Goiás. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.183-190, 2003.

SULLIVAN, T. W. Skeletal problems in poultry: Estimated Annual cost and descriptions. **Poultry Science**, v.73, n.6. p.879-882, 1994.

TALAMINI, D. J. D.; MARTINS, M. F.; NOVAES, M. **Produção e Mercado Nacional e Internacional do Frango**. Embrapa Suínos e Aves. Concórdia, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpas.embrapa.br/?ids=Sn6l70p1l>>. Acesso em: 25/04/2010.

USDA Agricultural Baseline Projections to 2015. Office of the Chief Economist, World Agricultural Outlook Board, U.S. Department of Agriculture. Prepared by the Interagency Agricultural Projections Committee. Baseline Report OCE-2006-1, 108 pp. Disponível em <http://www.usp.br/unicetex/geagro/biblioteca/USDA_Agricultural_Baseline_Projections_to_2015-16.pdf>. Acessado em: 26/04/2010.

VAYEGO, S. A.; DIONELLO, N. J. L.; FIGUEIREDO, E. A. P. Estimativas de Parâmetros e tendências genéticas para algumas características de importância econômica em linhagem paterna de frangos de corte sob seleção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.7, p.1230-1235, 2008.

VIANNA, C. F. A.; SILVA, M. A.; PIRES, A. V.; FONSECA, R. da; SOARES, P. R. Influência de Grupos Genéticos e de Níveis de Energia sobre Características de Carcaça de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p.1067-1073, 2000.

VIEIRA, J. G. H. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v.43, n.6, p.415-422, 1999.

WUTTKE, M.; MULLER, S.; NITSCHKE, D. P.; PAULSSON, M.; HANISCH, F. G.; MAURER, P. Structural Characterization of Human Recombinant and Bone-derived Bone Sialoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.39, p.36839-36848, 2001.

YANG, Y.; QIANG, C.; SAHAI, N. How Does Bone Sialoprotein Promote the Nucleation of Hydroxyapatite? A Molecular Dynamics Study Using Model Peptides of Different Conformations. **Langmuir**, v.26, n.12, p.9848-9859, 2010.

YOGARATNAM, V. Analysis of the causes of high rates of carcase rejection at a poultry processing plant . **The Veterinary Record**, v.137, n.9, p.215-217, 1995.

ZHOU, H.; DEEB, N.; EVOCK-CLOVER, C. M.; MITCHELL, A. D.; ASHWELL, C. M.; LAMONT, S. J. Genome-Wide Linkage Analysis to Identify Chromosomal Regions Affecting Phenotypic Traits in the Chicken. III. Skeletal Integrity. **Poultry Science**, v.86, p.255-266, 2007.

CAPÍTULO I – SEQUENCIAMENTO E DESCOBERTA DE POLIMORFISMOS EM GENES RELACIONADOS À INTEGRIDADE ÓSSEA EM LINHAS PURAS DE AVES

Escrito seguindo as “Normas para a apresentação de documentos científicos”.
Universidade Federal do Paraná – Sistema de Bibliotecas. Curitiba: Ed. UFPR, 2007.

RESUMO

A caracterização das diferenças genéticas e de como estas interferem nos mecanismos biológicos é uma importante maneira de identificar e classificar indivíduos. O uso da genética molecular para a investigação de mutações já vem sendo realizado há algumas décadas, e a diversidade de metodologias atualmente disponíveis permite seu uso para diferentes finalidades. Neste trabalho foram avaliadas condições de amplificação por PCR em 16 fragmentos dos genes calbidina, fator de transcrição “*runt-related*”, osteopontina, osteoprotegerina, proteína morfogenética óssea dois, sialoproteína óssea e osteopontina. Variações na concentração de $MgCl_2$ e alterações na temperatura de anelamento dos *primers* foram avaliadas. Dos 16 conjuntos de *primers*, 11 tiveram suas condições de amplificação estabelecidas. Destes, 10 foram selecionados para a reação de sequenciamento em amostras de DNA de 5 aves de uma linhagem de postura e 10 aves de uma linhagem de corte, pertencentes ao programa de melhoramento genético de aves da Embrapa Suínos e Aves. As sequências foram analisadas nos programas *Standen Package*, *Clustal* e *Phred/Phrap/Consed/Polyphred*. Foram identificados polimorfismos em nove dos dez conjuntos de *primers* sequenciados. A única exceção foi o *primer* *bmp2_p1*. Das mutações identificadas, 92 correspondem a polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e apenas uma representa inserção/deleção (Indel). O indel detectado corresponde a uma inserção de cinco nucleotídeos (ATTCC) e foi observado em todas as amostras sequenciadas para o *primer* *sost_p2*. A análise dos SNPs demonstrou que existe variação significativa, com poucos polimorfismos fixados em apenas uma das linhagens. Os resultados deste trabalho podem contribuir para futuros estudos, envolvendo a investigação de polimorfismos como marcadores moleculares para características de integridade óssea em aves.

Palavras chave: Integridade óssea. Sequenciamento. Mutações. Polimorfismo de nucleotídeo único. *Gallus gallus*

ABSTRACT

The characterization of genetic differences and how they interfere in the biological mechanisms, is an important way to identify and classify individuals. The use of molecular genetics to investigate mutations, have been performed for several decades, and the diversity of methodologies currently available allows its use in different applications. In this paper, we evaluated conditions by PCR amplification, in 16 fragments of calbidina, transcription factor “run-related”, osteopontin,

osteoprotegerin, bone morphogenetic protein two, bone sialoprotein and osteopontin genes. Variations in $MgCl_2$ and changes in primer annealing temperature were evaluated. Of the 16 primers sets, 11 had their amplification conditions established. Of these, ten were selected for sequencing reaction in five DNA sample from a layer line chicken and ten from a broiler line chicken belonging to breeding program at Embrapa Swine and Poultry Research Center. The sequences were analyzed in Standen Package, Clustal and Phred/Phrap/Consed/Polyphred software. Polymorphisms were identified in nine of ten sequenced primers. The only exception was the primer bmp2_p1. Of the mutations identified, 92 are single nucleotide polymorphisms (SNPs) and only one represents insertion/ deletion (Indel). The Indel detected, is a insertion of five nucleotides (ATTCC) and was observed in all samples sequenced with sost_p2 primer. The SNPs's analysis showed that there is significant variation, with few polymorphisms in only one group. The results of this paper may help future studies, involving the investigation of polymorphisms as molecular markers for bone integrity in chicken.

Keywords: Bone integrity. Sequencing. Mutations. Single nucleotide polymorphism. *Gallus gallus*

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos em genética de populações permitiram explorar inúmeras características observando apenas a variabilidade no fenótipo dos indivíduos. Darwin, um dos pioneiros, destacou a ação seletiva do ambiente sobre as variações existentes nas populações (GRIFFITHS *et al.*, 2006). No entanto, era preciso compreender como a relação entre o fenótipo e o genótipo se modifica de acordo com a característica observada.

Anos depois, com o nascimento formal da genética a partir da redescoberta do trabalho de Gregory Mendel publicado em 1865 (MIR *et al.*, 2004), diferentes pesquisas investigando a relação envolvendo o genótipo e o fenótipo têm sido desenvolvidas. Informações foram produzidas e têm permitido entender melhor a ação do genótipo sobre as características de um indivíduo.

A compreensão das diferenças ao nível molecular e de como estas atuam nos complexos mecanismos biológicos, é uma importante maneira de identificar, caracterizar e estudar indivíduos ou populações. As mutações na estrutura do DNA permitem estabelecer um perfil único para cada indivíduo. Estas mudanças, especialmente ao ocorrerem em regiões de éxons, podem determinar variantes de uma proteína, com mudanças na atividade enzimática ou mesmo com diferentes funções (LEWIN, 2004).

Mutações são por definição alterações que ocorrem na sequência de DNA de um gene, podendo ser induzidas, quando surgem após um tratamento proposital, ou espontâneas, quando surgem na ausência de um tratamento com agente mutagênico. No caso das mutações espontâneas, sabe-se que podem surgir por uma variedade de fontes, incluindo lesões espontâneas, erros de replicação do DNA e inserção de elementos de transposição (GRIFFITHS *et al.*, 2006).

As mutações já vêm sendo estudadas há algumas décadas, e a variedade de técnicas atualmente existentes permite que sejam exploradas para diferentes finalidades, entre as quais como marcadores moleculares. No melhoramento animal, a seleção assistida por marcadores tem sido uma das maneiras mais eficientes de incorporar às descobertas da genética molecular aos programas de melhoramento genético, e seu uso já é uma realidade para algumas espécies, entre as quais, bovinos, peixes e suínos (GARCIA, 2006; CAETANO, 2009).

O crescente fluxo de informações, associado à redução nos custos das análises (MELDRUM, 2000) e o desenvolvimento de sistemas avançados para avaliação genética, deverão ampliar o uso da seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento animal (LEDUR *et al.*, 2004; JEGO, 2008). Como consequência, espera-se que os resultados das complexas análises genômicas sejam gradualmente incorporados aos sistemas de seleção, e aliado aos métodos tradicionais, ampliem a eficiência dos programas de melhoramento genético.

Neste trabalho foram sequenciados fragmentos de genes envolvidos com a formação, desenvolvimento ou manutenção da estrutura óssea. As sequências foram analisadas e os polimorfismos identificados com o objetivo de serem usados como futuros marcadores para características de integridade óssea em aves.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Linhagens de aves

Duas linhagens de aves, uma de corte (TT) e outra de postura (CC) foram usadas para desenvolver as populações referências empregadas em estudos na área de genômica pela Embrapa Suínos e Aves, juntamente com outras instituições de ensino e pesquisa. Estas duas linhagens são pertencentes ao Programa de

Melhoramento Genético de Aves da Embrapa Suínos e Aves, possuem características e composição genética distintas, descritas a seguir.

2.1.1. Linhagem de corte (TT)

A linhagem de corte (Figura 1) teve sua origem a partir do cruzamento das raças *Cornish*, *Hamshire* e *White PlymouthRock*, e vem sendo selecionada desde 1992, com o objetivo de melhorar o peso corporal, conversão alimentar, rendimento de carcaça e de partes, viabilidade, fertilidade e eclodibilidade. As aves desta linhagem foram obtidas pelo acasalamento entre machos de corte e fêmeas de corte e criadas como matrizes de corte em gaiolas individuais.



FIGURA 1 – Reprodutor macho adulto da linhagem de corte TT. Fonte: Embrapa Suínos e Aves (2011)

2.1.2. Linhagem de postura (CC)

A linhagem de postura (Figura 2), originada da raça *White Leghorn* foi selecionada por oito gerações (Embrapa Suínos e Aves) para melhorar características de produção de ovos, peso do ovo, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclotividade, qualidade do ovo e um reduzido peso corporal. As aves desta linhagem foram obtidas pelo acasalamento entre machos e fêmeas de postura e criadas como matrizes de postura em gaiolas individuais.



FIGURA 2 – Ave de postura adulta da linhagem CC. Fonte: Embrapa Suínos e Aves (2011)

Indivíduos representativos destas duas linhagens foram utilizados no sequenciamento para descoberta de polimorfismos nos genes em estudo. As principais etapas desenvolvidas foram: desenhos dos primers, otimização das condições de amplificação por PCR, sequenciamento, análise das sequências e identificação de polimorfismos (Figura 3).

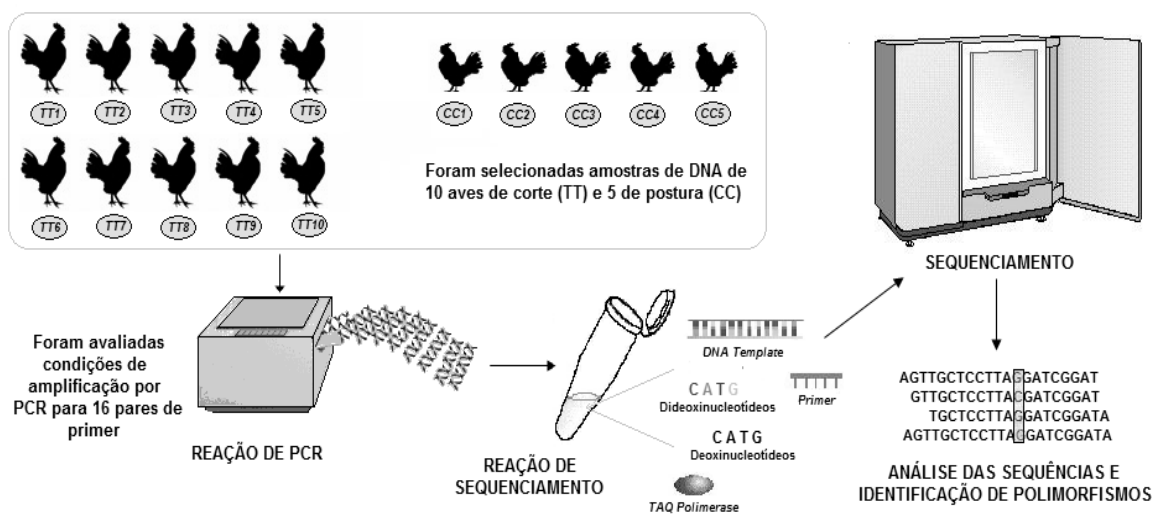


FIGURA 3 – Principais etapas envolvidas no sequenciamento e identificação de polimorfismos

2.2. Desenho dos iniciadores

Os iniciadores de nucleotídeos para amplificar as regiões de interesse foram desenhados com base na sequência de DNA de cada gene da espécie *Gallus gallus*

disponíveis no bando de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Para cada gene foram desenhados dois ou mais conjuntos de primers para amplificar diferentes regiões, incluindo regiões de éxons e íntrons.

A metodologia de “desenvolvimento ou desenho” de um *primer* é um procedimento simples. Requer, no entanto, a atenção para uma série de regras, que garantem uma maior probabilidade de que os *primers* desenhados anelem adequadamente nas regiões de interesse. Os *primers* usados neste estudo foram desenhados e avaliados quanto à qualidade no programa da empresa *IDT® Integrated DNA Technologies* disponível em <http://www.idtdna.com>.

Dentre os *primers* desenhados para este estudo, foram selecionados e sintetizados os que apresentassem temperaturas de anelamento próximas (Tabela 1). Esta escolha foi feita para facilitar as etapas posteriores de otimização das condições de amplificação por PCR e sequenciamento.

TABELA 1 – Gene, sequência, número de acesso ao *GenBank*, localização e tamanho do fragmento amplificado por cada conjunto de *primer*

| (continua) | | | | |
|------------------------------|---|-----------------------------|--------------------------|--------------|
| Gene | Sequência do <i>Primer</i> | Nº de acesso <i>GenBank</i> | Localização (Cromossomo) | Tamanho (pb) |
| BMP2_P1 Direto Reverso | 5' – CCATCCCTAATGAGGAGTCTGTCA – 3' 5' – AGTTTAGGTGATCTGCCAGCGGAA – 3' | NC_006090.2 | 3 | 603 |
| CALB_P1 Direto Reverso | 5' – TAGGCAATGGGTACATGGATGGGA – 3' 5' – ATATTCCTGGTGTGCAACACTGGC – 3' | NC_006089.2 | 2 | 648 |
| CALB_P4 Direto Reverso | 5' – ACTGCCAGCTGTTAGACAGTTCT – 3' 5' – TCCTTGCTGATGGCAGTACCTGAT – 3' | NC_006089.2 | 2 | 808 |
| IBSP_P1 Direto Reverso | 5' – ATAGGCACTGGGTATGCGGTCATT – 3' 5' – CAGCACTGATTCTTGTGGCTGCT – 3' | NC_006091.2 | 4 | 1109 |
| IBSP_P2 Direto Reverso | 5' – AGGGACTTGCACTCTGAACCATCCT – 3' 5' – ACATGGATGGCAATACTCAGGCCA – 3' | NC_006091.2 | 4 | 809 |
| OPG_P1 Direto Reverso | 5' – TGTTTGAAGCTACCTCCTCCTGCT – 3' 5' – TCGTGCACTCCTGCTTGATGTACT3 – 3' | NC_006089.2 | 2 | 704 |
| OPG_P2 Direto Reverso | 5' – ATCCATTTGCGTAAGGCTCTCTGC – 3' 5' – TCATCTCTGTTGCCCTGCTTGTCT – 3' | NC_006089.2 | 2 | 913 |
| OPG_P3 Direto Reverso | 5' – TAAGCACAGTGGAGCTGATGGGAA – 3' 5' – TCCCTTCCAACCCAAGCCATTCTA – 3' | NC_006089.2 | 2 | 1038 |
| OPG_P4 Direto Reverso | 5' – TAAGCACAGTGGAGCTGATGGGAA – 3' 5' – TCCTTCATGTCCCTTCCAACCCAA – 3' | NC_006089.2 | 2 | 1044 |

TABELA 1 – Gene, sequência, número de acesso ao *GenBank*, localização e tamanho do fragmento amplificado por cada conjunto de *primer*

| (conclusão) | | | | |
|-------------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|-----------------|
| Gene | Sequência do <i>Primer</i> | Nº de acesso <i>GenBank</i> | Localização (Cromossomo) | Tamanho (pb) |
| RUNX2_P1 Direto Reverso | 5' – TAGGTAAGTGGGCCAGCATCCAAA – 3' 5' – TACCACCGACTGAGCTTTGCTCTT – 3' | NC_006090.2 | 3 | 1044 |
| RUNX2_P2 Direto Reverso | 5' – GCAGCCAGGTGAATTTCTTGCTGT – 3' 5' – TGTGTCAAGTAAGTGAAGCGGTGGT – 3' | NC_006090.2 | 3 | 1055 |
| SOST_P1 Direto Reverso | 5' – AGGTGTGGGAGGGAATTAAAGGCT – 3' 5' – GCACAGACTGCACAACTGCAAGA – 3' | NC_006114.2 | 27 | 873 |
| SOST_P2 Direto Reverso | 5' – AGTGCTGATTTCCCTCACCTGGAA – 3' 5' – AAAGTCCTTCAGCTCGGACTGGTT – 3' | NC_006114.2 | 27 | 1220 |
| SPP1_P1 Direto Reverso | 5' – TTCAAGAAATGTGGAGCGTTGGGC – 3' 5' – ACGTTCCAAGCAGGAGTCACAGAT – 3' | NC_006091.2 | 4 | 1047 |
| SPP1_P2 Direto Reverso | 5' – ACGTAGGTTGCTGTGGTCAGATGT – 3' 5' – AACGTCGCTCTTCTCAAGCCCTA – 3' | NC_006091.2 | 4 | 969 |
| SPP1_P3 Direto Reverso | 5' – TGGGAAGGGTGGTGAGGATAAGAA – 3' 5' – ATGCACAGGTTCTCTTAACGGGT – 3' | NC_006091.2 | 4 | 766 |

BMP2 = Proteína morfogenética óssea 2; CALB = Calbidina ; IBSP = Sialoproteína óssea; OPG = Osteoprotegerina; RUNX2 = Fator de transcrição "*runx-related*"; SOST = Sosteopontina; SPP1 = Osteopontina

2.3. Otimização das condições de amplificação pela reação em cadeia da polimerase – PCR

Para amplificar os fragmentos desejados foram testadas diferentes condições para a reação de PCR. Inicialmente foi calculada a temperatura média de anelamento para cada um dos dezesseis conjuntos de *primers*, de acordo com informações que constavam nas especificações técnicas do fabricante dos *primers*.

Uma temperatura média de anelamento entre os dezesseis conjuntos de *primers* foi selecionada, e um primeiro teste para avaliar as condições de amplificação foi realizado. Em cada reação adicionou se 3,0 µL de DNA genômico na concentração de 25 ng/ µL à 22 µL do mix contendo: 2,5 µL de tampão 10X, 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTP (10 mM), 2,5 µL do primer direto (2 pmol/ µL), 2,5 µL do primer reverso (2 pmol/ µL), 0,3 µL da enzima *Taq DNA Polimerase*, *Invitrogen*® (5U/ µL) e completado com H₂O ultra pura para volume final de 25 µL.

As condições de amplificação programadas no termociclador envolveram as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, 35 ciclos de três

minutos, sendo um minuto para cada sub etapa de desnaturação, anelamento e extensão a 95°C, 59°C e 72°C respectivamente, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para os conjuntos de *primers* que não amplificaram adequadamente, novas temperaturas de anelamento ou variações na concentração de $MgCl_2$ foram testadas. A amplitude do gradiente de temperatura para cada conjunto de *primer* variou de acordo com as avaliações feitas com base no primeiro teste. Em geral a variação foi de 2°C acima e 3°C abaixo da temperatura inicialmente testada. Quanto ao $MgCl_2$, uma redução na concentração foi avaliada para os *primers* opg_p2 e ibsp_p1.

A partir das condições de amplificação para a reação de PCR estabelecidas para pelo menos um par de *primer* de cada gene, foram selecionados os que apresentassem a mesma temperatura de anelamento. Para estes *primers* foi realizado reação de PCR em dez aves da linhagem de corte (TT) e cinco da linhagem de postura (CC), e posterior sequenciamento.

2.4. Quantificação da reação de PCR

Após a amplificação por PCR, 3,0 µL de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,01% de brometo de etídeo, e submetidas à corrente elétrica de 80 V por 50 minutos em TBE 1X (tris-borato-EDTA). Foram usados padrões de peso de DNA molecular 100pb (100 bp DNA Ladder – *Promega Corporation*) e de concentração de DNA molecular pGEN a 20ng/ µL (pGEN®-T Easy Vector System I – *Applied Biosystems*). O gel foi observado em transluminador ultravioleta e a concentração estimada pela comparação visual entre a intensidade do *slot* de cada amostra e a do marcador pGEN.

2.5. Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi feita seguindo o protocolo do Laboratório de Sanidade e Genética Animal da Embrapa Suínos e Aves, baseado em recomendações da *Applied Biosystems*, para o *Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (*Applied Biosystems*). Foram sequenciados dez

indivíduos machos parentais da linhagem de corte e cinco fêmeas parentais da linhagem de postura. Para cada reação de sequenciamento foram usados: 3 µL de *Tampão Save Money* (200 mM de Tris pH 9; 0,5 mM MgCl₂); 2,5 µL do *primer* direto ou reverso (2,0 pmol/ µL), 2 µL do *Kit Big Dye*; 70 à 100 ng do produto de PCR e completado com H₂O ultra pura para um volume final de 20 µL.

O programa usado para a reação de sequenciamento envolveu as seguintes etapas: desnaturação a 96°C por 35 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos e extensão a 60°C por quatro minutos em um total de 30 ciclos sucessivos.

2.6. Precipitação da reação de sequenciamento

A precipitação da reação de sequenciamento foi realizada em placa com capacidade para 96 amostras. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 65% a cada reação. A mistura foi homogeneizada (vórtex) e incubada no escuro a temperatura ambiente por 15 minutos. Após, foi centrifugada por 15 minutos a 1630 xg na temperatura de 21°C e o sobrenadante removido de uma única vez por inversão. Foi adicionado 200 µL de etanol 60%, homogeneizado (vórtex) e centrifugado por 20 minutos a 2250 xg na temperatura de 21°C. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa, e o excesso de etanol removido com um leve *spin* invertido até 69 xg. Em seguida as amostras foram incubadas por meia hora a 40°C para completa remoção do etanol e armazenadas em freezer a -20°C.

2.7. Aplicação das amostras no sequenciador

As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida, desnaturadas a 95°C por 5 minutos e imediatamente resfriadas em gelo. Em seguida aplicadas no sequenciador ABI 3130xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e submetidas à eletroforese em capilar de 80 cm.

2.8. Análise das sequências e descrição dos polimorfismos

As sequências correspondentes aos 15 indivíduos parentais sequenciados foram analisadas e editadas no programa *Standen Package* (STADEN, 1996) e alinhadas no programa *Clustal* (THOMPSON *et al.*, 1994). Também foi usado o

programa *Phred/Phrap/Consed* (Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998) para analisar a qualidade e realizar a montagem das sequências, enquanto que a análise dos SNPs foi feita pelo programa *Polyphred* (Nickerson *et al.*, 1997). Em ambos os programas, foram consideradas para a análise e identificação de polimorfismos somente regiões com qualidade igual ou superior a 20, valor este estipulado como qualidade mínima.

Apenas os polimorfismos identificados em ambos os programas foram aceitos como verdadeiros, e descritos quanto à localização em relação à sequência consenso. Este procedimento foi feito para excluir das análises possíveis falsos positivos, ocasionados por erros de incorporação ou deleção de bases.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Otimização das condições de amplificação por PCR

Para o primeiro teste de padronização das condições de amplificação por PCR, foi usada a mesma temperatura para os dezesseis conjuntos de *primers*. A temperatura foi determinada a partir da média simples entre os dezesseis pares de *primers*, com base nas temperaturas recomendadas pelo fabricante para cada par de *primer* usando a fórmula abaixo.

$$T_{Média} = \frac{T_{Média \text{ Primer } 1} + T_{Média \text{ Primer } 2} + + T_{Média \text{ Primer } n}}{n}$$

Onde:

$T_{Média}$ = Temperatura média;

$T_{Média \text{ primer}}$ = Temperatura média de cada par de *primer*;

n = Número de pares de primers testados.

A temperatura média obtida foi de aproximadamente 59°C, sendo esta a temperatura de anelamento selecionada para o primeiro teste. As condições programadas no termociclador envolveram as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, 35 ciclos de três minutos, sendo um minuto para cada sub etapa de desnaturação, anelamento e extensão a 95°C, 59°C e 72°C

respectivamente, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os componentes, volumes e concentrações usados na reação de PCR são mostrados na tabela 2.

TABELA 2 – Volumes e concentrações dos componentes usados na reação em cadeia da polimerase – PCR

| Reagente | Volume (µL) | Concentração | Concentração final |
|-----------------------------|-------------|--------------|--------------------|
| Tampão | 2,5 | 10 X | 1 X |
| dNTPs | 1,0 | 10 mM | 0,04mM |
| MgCl ₂ | 1,0 | 50 mM | 2,0mM |
| Primer R | 2,5 | 2,0 pmol/ µL | 0,2 pmol/ µL |
| Primer F | 2,5 | 2,0 pmol/ µL | 0,2 pmol/ µL |
| <i>Taq</i> polimerase | 0,3 | 5U/ µL | 0,06 U/ µL |
| DNA | 3,0 | 25 ng/µL | 3,0 ng/ µL |
| H ₂ O ultra pura | 12,2 | | |

Bons resultados com a temperatura de 59°C foram obtidos para dez dos dezesesseis conjuntos de *primers* testados, com uma boa amplificação e a ausência ou um número insignificante de fragmentos inespecíficos (Figuras 4 e 5).

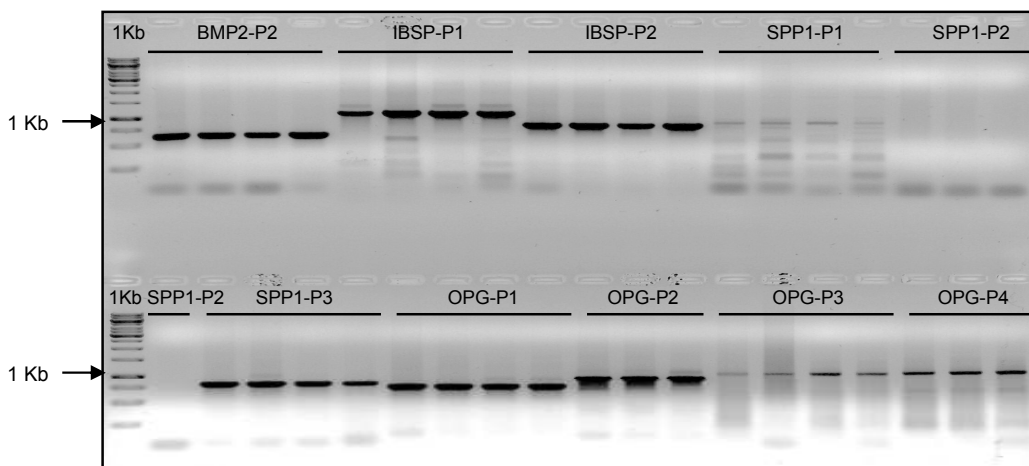


FIGURA 4 – Avaliação das condições de amplificação para os *primers* bmp2_p2, ibsp_p1, ibsp_p2, spp1_p1, spp1_p2, spp1_p3, opg_p1, opg_p2, opg_p3, e opg_p4 com amostras de DNA, aplicadas em gel de agarose 1%

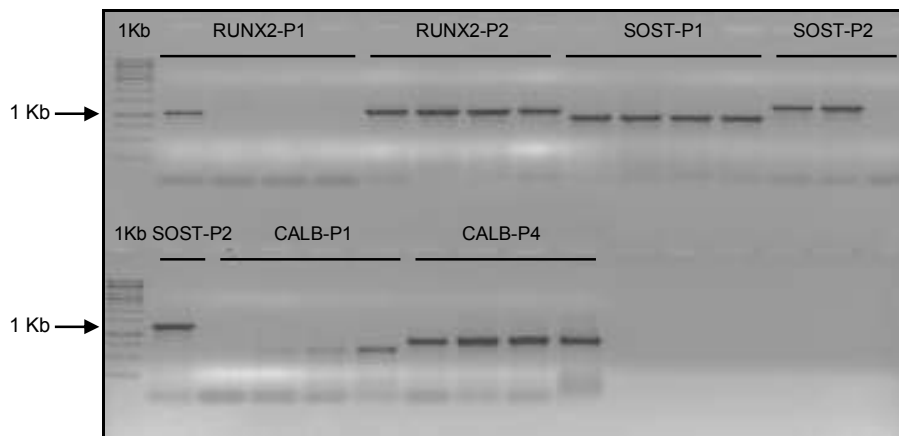


FIGURA 5 – Avaliação das condições de amplificação para os pares de *primer* runx2_p1, runx2_p2, sost_p1, sost_p2, calb_p1 e calb_p4 com amostras de DNA, aplicadas em gel de agarose 1%

Para os *primers* ibsp_p1, opg_p2, opg_p3, opg_p4, spp1_p1 e spp1_p2 que não amplificaram adequadamente ou que apresentaram fragmentos inespecíficos, novos testes foram avaliados. Embora diferentes parâmetros possam ser alterados em uma reação de PCR, usualmente variações na concentração de $MgCl_2$ e temperatura de anelamento são alguns dos primeiros parâmetros avaliados na tentativa de padronizar uma reação de PCR. Modificações na concentração de $MgCl_2$ e gradientes com diferentes temperaturas de anelamento foram, analisados afim de estabelecer condições adequadas para a amplificação dos *primers* acima citados.

3.1.1. Alterações na concentração de $MgCl_2$

O $MgCl_2$ é um reagente crítico em uma reação de PCR, atuando como doador estável de íons Mg^{2+} , que são cofatores indispensáveis para a atividade da enzima polimerase. Alterações na concentração de $MgCl_2$ produzem mudanças na especificidade da PCR e consequentemente no produto amplificado.

No caso dos *primers* ibsp_p1 e opg_p2, o primeiro teste com temperatura de anelamento de 59°C demonstrou significativa amplificação dos fragmentos de interesse, mas com possíveis fragmentos inespecíficos de tamanhos muito próximos dos fragmentos desejados. Para reduzir a atividade da enzima polimerase uma redução na concentração de $MgCl_2$ de 2,0mM/ μL para 1,5mM/ μL (o que

corresponde a uma redução de 1 μ L para 0,75 μ L no volume de MgCl₂ 50Mm) foi avaliada (Figura 6). Os demais componentes, concentrações, condições da reação de PCR e amostras de DNA não foram alterados.

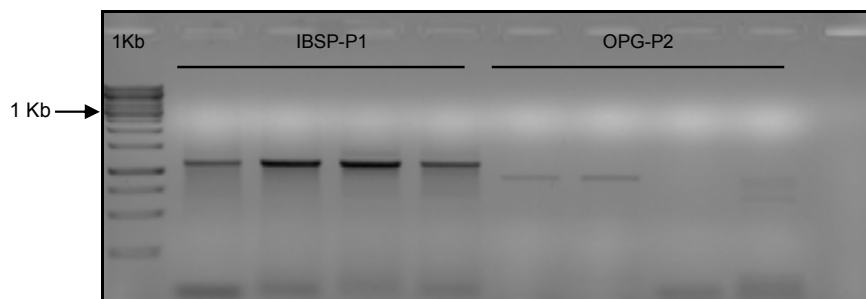


FIGURA 6 – Fragmentos amplificados com os *primers* ibsp_p2 e opg_p2 com redução na concentração de MgCl₂ 50mM, aplicadas em gel de agarose 1%

A redução na concentração de MgCl₂ demonstrou bons resultados para o *primer* ibsp_p1. Embora a intensidade na amplificação do fragmento de 1109 bp tenha sido inferior a reação anterior, a ausência de fragmentos inespecíficos associado a boa amplificação do fragmento de interesse permitiram estabelecer condições apropriadas para a reação de PCR.

Para o *primer* opg_p2 foi notado uma pequena amplificação do fragmento de 913 bp, demonstrando que mesmo pequenas alterações na concentração de MgCl₂ produzem efeitos bastante significativos na atividade da enzima *Taq DNA Polimerase*. Este resultado sugere que reações de PCR com concentrações de 2,0mM/ μ L de MgCl₂, associado a mudanças na temperatura de anelamento devem ser considerados na tentativa de reduzir a presença de fragmentos inespecíficos para o *primer* opg_p2.

3.1.2. Alterações na temperatura de anelamento do *primer*

A temperatura de anelamento é o fator mais significativo que afeta a estringência no anelamento do *primer*. Temperaturas de anelamento adequadas tornam o pareamento *primer* DNA molde mais seletivo e reduzem a possibilidade de produtos inespecíficos. Mudanças na temperatura de anelamento são usualmente

uma das primeiras alterações testadas quando se padroniza uma reação de PCR, especialmente quando se tem baixa amplificação do fragmento desejado.

No caso dos *primers* opg_p2, opg_p3 e opg_p4 um gradiente com temperaturas de anelamento de 54,9°C, 55,8°C, 56,9°C, 58,2°C e 59,5°C foi avaliado usando duas amostras de DNA. Para os *primers* spp1_p1 e spp1_p2 um gradiente com temperaturas de anelamento de 57°C, 57,9°C, 59,1°C e 60,4°C foi testado com uma amostra de DNA. Os componentes, volumes, concentrações e condições da reação de PCR (com exceção da temperatura de anelamento) foram os mesmos do primeiro teste. Os resultados são mostrados na figura 7.

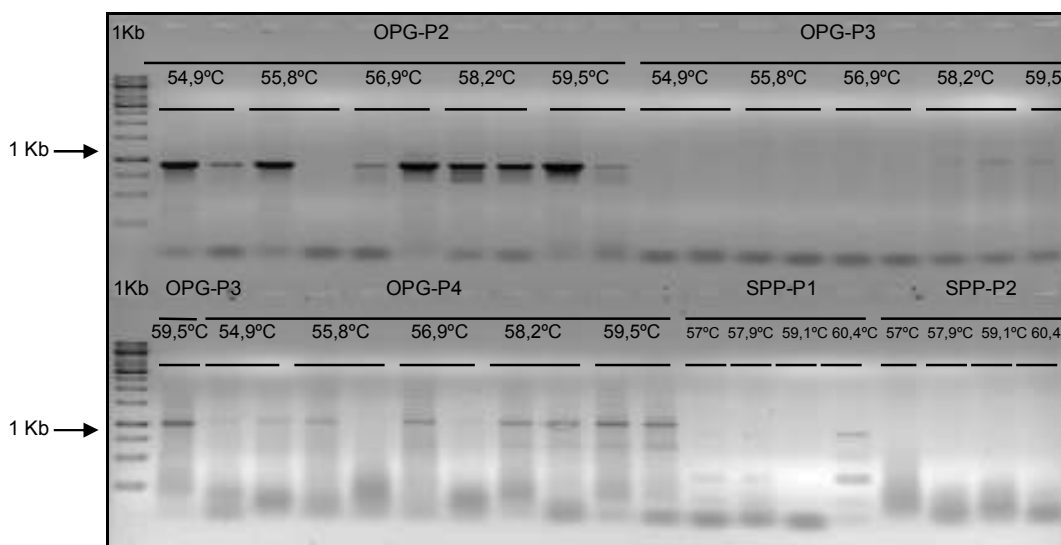


FIGURA 7 – Avaliação das condições de amplificação para os pares de *primer* opg_p2, opg_p3, opg_p4, spp1_p1 e spp1_p2 com amostras de DNA padrão, aplicadas em gel de agarose 1%

Variações na temperatura de anelamento demonstraram mudanças na capacidade de amplificação, com resultados promissores para o *primer* opg_p2 (Figura 7). Para este conjunto de *primer* houve amplificação do fragmento de interesse em todas as temperaturas avaliadas. A presença de fragmentos inespecíficos de tamanhos próximos ao de interesse nas temperaturas de 58,2°C e 59,5°C, no entanto, sugerem o uso de temperaturas de anelamento mais baixas, em especial a 56°C. Embora as condições de amplificação tenham sido favoráveis usando 2,0mM/ μ L de $MgCl_2$ e temperaturas de anelamento entre 55°C e 58°C, um

novo teste, de preferência com outras amostras de DNA, deve ser analisado para que as melhores condições de amplificação para este *primer* sejam definidas.

Com exceção do *primer* opg_p4 que apresentou uma pequena amplificação, mas com elevada quantidade de fragmentos inespecíficos, os demais conjuntos de primers não apresentaram resultados promissores frente às mudanças de temperatura avaliadas.

Após variações na concentração de MgCl₂ e temperatura de anelamento, onze dos dezesseis conjuntos de *primers* inicialmente testados tiveram suas condições de amplificação estabelecidas (Tabela 3).

TABELA 1 – Concentração de MgCl₂ e temperatura de anelamento padronizadas para cada par de *primer*

| <i>Primer</i> | MgCl ₂ (mM) | Temp. (°C) | <i>Primer</i> | MgCl ₂ (mM) | Temp. (°C) |
|---------------|------------------------|------------|---------------|------------------------|------------|
| bmp2_p1 | 2,0 | 59 | opg_p4 | * | * |
| calb_p1 | 2,0 | 59 | runx2_p1 | 2,0 | 59 |
| calb_p4 | 2,0 | 59 | runx2_p2 | 2,0 | 59 |
| ibsp_p1 | 1,5 | 59 | sost_p1 | 2,0 | 59 |
| ibsp_p2 | 2,0 | 59 | sost_p2 | 2,0 | 59 |
| opg_p1 | 2,0 | 59 | spp1_p1 | * | * |
| opg_p2 | * | * | spp1_p2 | * | * |
| opg_p3 | * | * | spp1_p3 | 2,0 | 59 |

* Condições de amplificação não estabelecidas

Dentre os *primers* que tiveram suas condições de amplificação por PCR estabelecidas, foram selecionados para reação de sequenciamento os *primers* bmp2_p1, calb_p1, calb_p4, ibsp_p2, opg_p1, runx2_p1, runx2_p2, sost_p1, sost_p2 e spp1_p3. Estes foram escolhidos por apresentarem as mesmas condições e concentração dos reagentes para a reação de PCR. Isso facilita a reação de sequenciamento, uma vez que para este trabalho, este procedimento seria realizado prioritariamente em placas com capacidade para 96 amostras.

3.2. Quantificação da reação de PCR

A quantificação dos produtos de PCR foi feita de maneira visual pela comparação entre a intensidade do marcador de peso molecular (pGEN) e as amostras aplicados em gel de agarose 1%.

A determinação da concentração do produto amplificado na reação de PCR é fundamental não somente para avaliar a intensidade da reação, como também para determinar o volume a ser usado na reação de sequenciamento.

Os resultados da quantificação variaram de acordo com a capacidade de amplificação para cada par de *primer*, com valores que oscilaram entre 20ng/ μ L a 50ng/ μ L (Tabelas 4 e 5). Como não foram observadas diferenças significativas na concentração entre as quinze amostras amplificadas para cada conjunto de *primer*, um valor médio de concentração foi determinado para cada um deles.

TABELAS 2 e 5 – Concentrações médias após reação de PCR para cada *primer*

| <i>Primer</i> | Conc. Média (ng/ μ L) | <i>Primer</i> | Conc. Média (ng/ μ L) |
|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| bmp2_p1 | 50,0 | runx2_p1 | 30,0 |
| calb_p1 | 25,0 | runx2_p2 | 30,0 |
| calb_p4 | 37,5 | sost_p1 | 37,5 |
| lbsp_p2 | 37,5 | sost_p2 | 20,0 |
| opg_p1 | 37,5 | spp1_p3 | 20,0 |
| Conc. Média – Concentração Média | | Conc. Média – Concentração Média | |

3.3. Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo da Embrapa Suínos e Aves seguindo recomendações da *Applied Biosystems* em 15 amostras de DNA, sendo dez machos da linhagem de corte (TT) e cinco fêmeas da linhagem de postura (CC). Foram efetuadas duas reações de sequenciamento para cada indivíduo, uma utilizando o *primer* direto e outra o reverso.

Em virtude de diferenças na magnitude de amplificação da reação de PCR para cada um dos conjuntos de *primer*, volumes variáveis do produto amplificado foram usados para satisfazer a quantidade recomendada pelo protocolo de sequenciamento. Usou-se 2,5 μ L para o *primers* bmp2_p1, calb_p4, runx2_p1,

runx2_p2 e sost_p1; 3,0 µL para os *primers* ibsp_p2, opg_p1 e sost_p2 e 4,0 µL para os *primers* calb_p1 e spp1_p3. Já os volumes e concentrações do tampão *Save Money* e *Big Dye* foram os mesmos para todas as reações.

Após a reação de sequenciamento as amostras foram precipitadas e aplicadas no sequenciador automático ABI3130xl *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). Na figura 8 está parte do cromatograma obtido para uma das sequências do *primer* bmp2_p1, como exemplo dos sequenciamentos realizados. As setas indicam dois lócus heterozigotos observados em todas as amostras sequenciadas com este conjunto de *primer*.

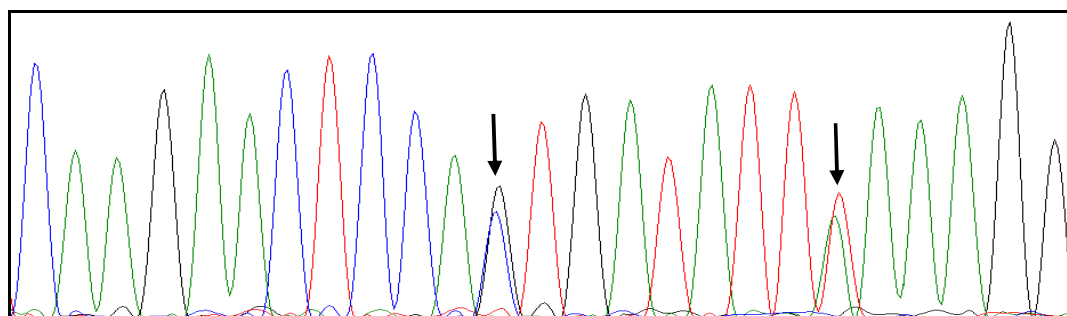


FIGURA 8 – Parte do cromatograma de uma das amostras sequenciadas

3.4. Análise das sequências

A detecção de um polimorfismo envolve a comparação entre sequências de DNA de um mesmo locus gênico em diferentes indivíduos de uma determinada população, de maneira que seja possível identificar variações que caracterizem diferentes alelos (NINOV, 2006).

Somente os polimorfismos observados por ambos os programas usados para a análise e alinhamento das sequências, e localizados em regiões de qualidade igual ou superior a 20 foram classificados como SNPs. Este procedimento foi feito para excluir das análises possíveis falsos positivos, ocasionados por erros de incorporação ou deleção de bases.

Os SNPs confirmados como verdadeiros foram descritos quanto à localização com base na sequência consenso. Esta sequência consiste em uma sequência de nucleotídeos gerada pelo programa *Phred/PhrapConsed* contendo a série de nucleotídeos que prevaleceu no alinhamento para cada um dos *contigs* analisados.

3.5. Descrição dos polimorfismos

A análise das sequências feita nos programas *Standen Package* e *Clustal*, e confirmada pelo programa *Phred/Phrap/Consed/Polyphred* revelou a existência de polimorfismos do tipo SNP em nove dos dez fragmentos de genes sequenciados. Em média ocorreram 1,09 SNPs/ 100bp. Essa relação é variável para cada região do genoma. Ninov (2006) em pesquisa usando aves pertencentes às mesmas linhagens encontrou 1,6 SNPs/ a cada 100bp, enquanto que Almeida *et al.* (2005) observaram apenas 0,26 SNP/ para cada 100bp. Já Wong *et al.* (2004) em estudo no qual descrevem um mapa de variação genética no genoma da galinha relata uma média de 0,5 SNP/ para cada 100bp.

O número total de SNPs identificados por fragmento variou de zero a dezessete (Tabelas 6 e 7). Estes foram classificados de acordo com a substituição de nucleotídeos em transições e transversões. Dos 92 SNPs identificados, 69 (75%) corresponderam a transições e 23 (25%) a transversões. Cassoli *et al.* (2007) ao sequenciar genes expressos pelo hipotálamo e pituitária nessas duas linhagens de aves, identificaram 77 SNPs, dos quais 64,9% corresponderam a transições e 35,1% a transversões.

TABELAS 6 e 7 – Número de SNPs identificados após análises nos programas *Standen Package*, *Clustal* e *Phred/Phrap/Consed*

| <i>Primer</i> | Número de SNPs | <i>Primer</i> | Número de SNPs |
|---------------|----------------|---------------|----------------|
| bmp2_p1 | § | runx2_p1 | 17 |
| calb_p1 | 7 | runx2_p2 | 8 |
| calb_p4 | 14 | sost_p1 | 5 |
| ibsp_p2 | 9 | sost_p2 | 12 |
| opg_p1 | 9 | spp1_p3 | 11 |

§ Não foram observados SNPs

Wong *et al.* (2004) destacam que o número médio de SNPs e *Indels*, de maneira geral, independem do tamanho do cromossomo. Enquanto apenas um *Indel* foi detectado entre os fragmentos avaliados, noventa e dois SNPs foram confirmados após análise das mesmas sequências. Foram identificados 1,39 SNPs/ 100bp entre os fragmentos localizados no cromossomo dois, 0,93 SNP/ 100bp no

cromossomo três, 1,27 SNPs/ 100bp no cromossomo quatro e 0,81 SNP/ 100bp no cromossomo vinte sete.

Os polimorfismos detectados ocorreram tanto em regiões de éxon como em regiões de íntron, embora o número absoluto de SNPs em regiões de íntron tenha sido maior. Entre as amostras amplificadas com o *primer* bmp2_p1 nenhum polimorfismo foi observado. Já nas sequências amplificadas com o *primer* calb_p1, sete SNPs foram confirmados, o que representa em média de 1,08 SNPs/ 100bp. Prevaleceram mutações envolvendo mudanças de bases púricas e pirimídicas, em comparação a mutações do tipo transversão (Figura 9).

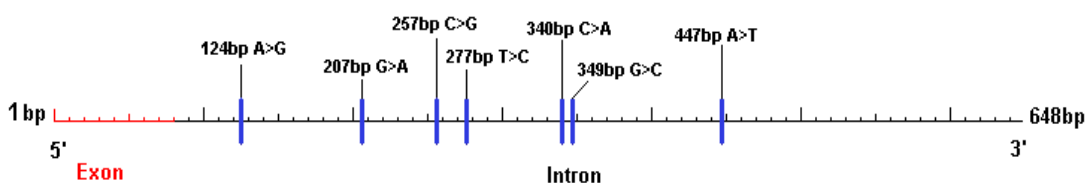


FIGURA 9 – SNPs identificados no *contig* do fragmento gerado com o *primer* calb_p1 e suas respectivas posições

As substituições A→G na posição 124bp, G→A na posição 207bp e C→G na posição 257bp ocorreram tanto em homozigose como em heterozigose para ambas as linhagens. Já as substituições T→C na posição 277bp, C→A na posição 340bp, G→C na posição 349bp e A→T na posição 447bp ocorreram somente em homozigose para as aves da linhagem de corte. Entre as aves de postura, apenas uma apresentou heterozigose para estes quatro SNPs. As demais aves desta linhagem mantiveram o mesmo perfil observado para as aves de corte. A tabela 8 mostra a frequência dos alelos mutantes calculados para cada um dos SNPs.

TABELA 8 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* calb_p1

| Posição (bp) | Alelo Consenso | Alelo Mutante | Frequência Alelo Mutante |
|--------------|----------------|---------------|--------------------------|
| 124 | A | G | 0,375 |
| 207 | G | A | 0,4 |
| 257 | C | G | 0,33 |
| 277 | T | C | 0,03 |
| 340 | C | A | 0,03 |
| 349 | G | C | 0,03 |
| 447 | A | T | 0,03 |

Quatorze SNPs foram detectados nas sequências amplificadas com o *primer* calb_p4, todos localizados em região de íntron. Em média ocorreram 1,73 SNPs/100bp, prevalecendo mutações envolvendo a troca entre bases púricas e pirimídicas frente a mutações do tipo “transversão” (Figura 10).

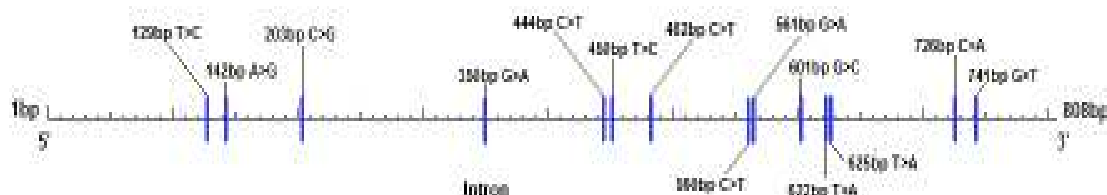


FIGURA 10 – SNPs identificados no *contig* do fragmento gerado com o *primer* calb_p4 e suas respectivas posições

Com exceção da substituição C→A na posição de 726bp que apresentou apenas animais homozigotos para aves de postura, as demais mutações revelaram pelo menos dois dos três genótipos possíveis para ambas as linhagens. A frequência dos alelos mutantes é mostrada na tabela 9.

TABELA 9 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* calb_p4

| Posição (bp) | Alelo Consenso | Alelo Mutante | Frequência Alelo Mutante |
|--------------|----------------|---------------|--------------------------|
| 129 | T | C | 0,20 |
| 142 | A | G | 0,19 |
| 203 | C | G | 0,46 |
| 350 | G | A | 0,20 |
| 444 | C | T | 0,20 |
| 450 | T | C | 0,23 |
| 482 | C | T | 0,20 |
| 560 | C | T | 0,20 |
| 561 | G | A | 0,33 |
| 601 | G | C | 0,03 |
| 622 | T | A | 0,33 |
| 625 | T | A | 0,30 |
| 726 | C | A | 0,20 |
| 741 | G | T | 0,28 |

Entre as sequências amplificadas com o *primer* ibsp_p2 foram identificados nove SNPs, o que corresponde a aproximadamente 1,11 SNPs/100bp. Somente mutações envolvendo a transição entre bases foram observadas, prevalecendo

substituições entre bases púricas. Entre os polimorfismos identificados, apenas o SNP localizado na posição de 211bp se encontra em região de íntron. Os demais SNPs estão localizados em regiões de éxon (Figura 11).

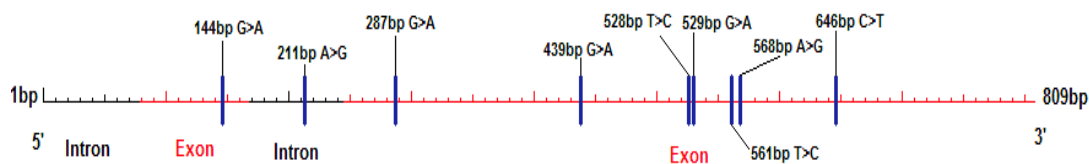


FIGURA 11 – SNPs identificados no *contig* do fragmento gerado com o *primer* ibsp_p2 e suas respectivas posições

As substituições G→A na posição 287bp, T→C na posição 528bp, G→A na posição 529bp, T→C na posição 561bp e A→G na posição 568bp ocorreram apenas em homozigose entre as aves de postura. Na linhagem de corte, tanto aves em homozigose como em heterozigose foram identificadas.

A substituição G→A na posição 287bp apresentou somente um animal heterozigoto na linhagem de corte. Os demais animais, incluindo as aves de postura apresentaram perfil homozigoto. Já os SNPs G→A nas posições 144bp e 439bp, e C→T na posição 646bp ocorrem tanto em homozigose como em heterozigose para ambas as linhagens. A tabela 10 mostra a frequência dos alelos mutantes para cada SNP.

TABELA 10 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* ibsp_p2

| Posição (bp) | Alelo Consenso | Alelo Mutante | Frequência Alelo Mutante |
|--------------|----------------|---------------|--------------------------|
| 144 | G | A | 0,36 |
| 211 | A | G | 0,36 |
| 287 | G | A | 0,03 |
| 439 | G | A | 0,46 |
| 528 | T | C | 0,45 |
| 529 | G | A | 0,45 |
| 561 | T | C | 0,36 |
| 568 | A | G | 0,36 |
| 646 | C | T | 0,18 |

Entre as sequências amplificadas com o *primer* opg_p1, foram confirmados nove polimorfismos do tipo SNP, o que representa uma média de 1,28 SNPs/ 100bp.

Destes, sete estão localizados em região de íntron e dois em região de éxon (Figura 12). Prevaleceram mutações do tipo transição, especialmente envolvendo a mudança entre bases púricas.

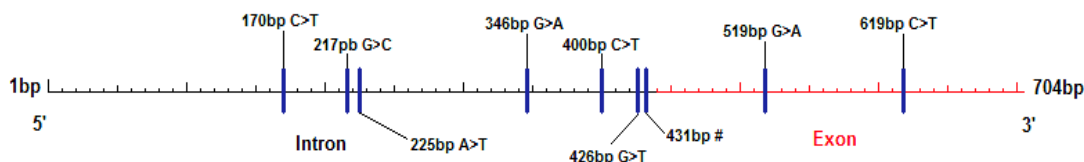


FIGURA 12 – SNPs identificados no *contig* do fragmento gerado com o *primer* opg_p1 e suas respectivas posições

Entre as sequências amplificadas com o *primer* opg_p1, a substituição T→C na posição 431bp foi detectada somente em relação à sequência depositada no *GenBank*. Já entre as amostras sequenciadas, não foi observado alterações para esta posição.

As substituições C→T na posição 170bp, G→C na posição 217bp, A→T na posição 225bp, C→T na posição 400bp e G→T na posição 426bp mantiveram um mesmo perfil de alterações, com os mesmos seis indivíduos apresentando o genótipo heterozigoto para todas as posições. Destes, duas eram aves de postura e quatro de corte. As demais aves também mantiveram a mesma relação entre os SNPs para estas posições, porém com genótipos homozigotos. As substituições G→A nas posições 346bp e 519bp, e C→T na posição 619bp ocorreram somente em aves de corte. Entre as aves de postura, nenhuma apresentou substituição em relação à sequência consenso. A tabela 11 mostra a frequência do alelo mutante para cada um dos SNPs identificados.

TABELA 11 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* opg_p1

(continua)

| Posição (bp) | Alelo Consenso | Alelo Mutante | Frequência Alelo Mutante |
|--------------|----------------|---------------|--------------------------|
| 170 | C | T | 0,29 |
| 217 | G | C | 0,29 |
| 225 | A | T | 0,29 |
| 346 | G | A | 0,14 |

TABELA 11 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* opg_p1

| Posição (bp) | Alelo Consenso | Alelo Mutante | (conclusão) |
|--------------|----------------|----------------|--------------------------|
| | | | Frequência Alelo Mutante |
| 400 | C | T | 0,29 |
| 426 | G | T | 0,29 |
| 431 | T | C [#] | ## |
| 519 | G | A | 0,32 |
| 619 | C | T | 0,36 |

[#] Não foi observado SNP entre as amostras sequenciadas. O alelo mutante para este SNP é descrito em relação à sequência depositada no *GenBank*

^{##} Frequência alélica não calculada

SNPs identificados no gene OPG em humanos apresentaram associação consistente com diferentes características, entre as quais a densidade óssea. Hsu *et al.*, (2006) identificaram quatro SNPs na região promotora deste gene, os quais apresentaram significativa associação com a *BMD* – *Bone mineral density* em indivíduos do sexo masculino. Já Yamada *et al.*, (2003) identificaram SNPs também localizados na região promotora, cuja associação significativa com a *BMD* estava associada com indivíduos do sexo feminino.

Embora bastante explorado em pesquisas envolvendo sua caracterização em humanos, poucas publicações envolvendo a investigação deste gene em animais, mais especificamente em aves, são descritos na literatura. A osteoprotegerina é uma proteína que está envolvida nos processos de reabsorção óssea, e, portanto representa um potencial marcador para características envolvidas com a integridade óssea de aves.

Da mesma maneira que a osteoprotegerina, pesquisas envolvendo o estudo do gene *runx2*, limitam se basicamente a caracterização para fins de saúde humana. Já foram inclusive identificados SNPs que demonstraram associação consistente com a *BMD* para humanos (LEE *et al.*, 2009). Apesar disso, poucas investigações neste gene são descritas para aves.

A análise das sequências deste gene revelou a existência de 17 polimorfismos do tipo SNP entre as sequências amplificadas a partir do *primer* *runx2_p1*, o que representa em média de 1,63 SNPs/ 100bp. Os SNPs detectados estão em região de íntron, sendo oito transições envolvendo mudanças entre bases púricas e quatro entre bases pirimídicas. Os outros cinco SNPs correspondem a mutações do tipo transverção (Figura 13).

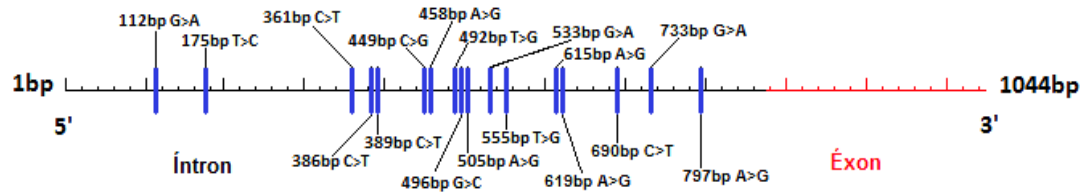


FIGURA 13 – SNPs identificados no *contig* do fragmento gerado com o *primer* runx2_p1 e suas respectivas posições

As substituições G→A na posição 112bp, C→G na posição 449bp, A→G na posição 458bp, T→G na posição 492bp, G→C na posição 496bp, A→G na posição 505bp, G→A na posição 533bp, A→G na posição 615bp, C→T na posição 690bp e G→A na posição 733bp foram observadas somente em aves da linhagem de corte. Entre as aves de postura não foram observadas substituições para estas posições. Os demais SNPs ocorreram tanto em aves da linhagem de corte como de postura. A frequência dos alelos mutantes é mostrada na tabela 12.

TABELA 12 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* runx2_p1

| Posição (bp) | Alelo Consenso | Alelo Mutante | Frequência Alelo Mutante |
|--------------|----------------|---------------|--------------------------|
| 112 | G | A | 0,125 |
| 175 | T | C | 0,39 |
| 361 | C | T | 0,50 |
| 386 | C | T | 0,47 |
| 389 | C | T | 0,17 |
| 449 | C | G | 0,03 |
| 458 | A | G | 0,03 |
| 492 | T | G | 0,23 |
| 496 | G | C | 0,27 |
| 505 | A | G | 0,23 |
| 533 | G | A | 0,03 |
| 555 | T | G | 0,30 |
| 615 | A | G | 0,03 |
| 619 | A | G | 0,30 |
| 690 | C | T | 0,03 |
| 733 | G | A | 0,47 |
| 797 | A | G | 0,50 |

Já entre as amostras amplificadas com o *primer* runx2_p2, foram detectados oito SNPs, todos localizados em região de íntron (Figura 14). Isso corresponde a

uma média de 0,76 SNP/ 100bp. Predominaram mutações do tipo transição, especialmente entre bases pirimídicas em comparação a mutações envolvendo a transversão entre bases.

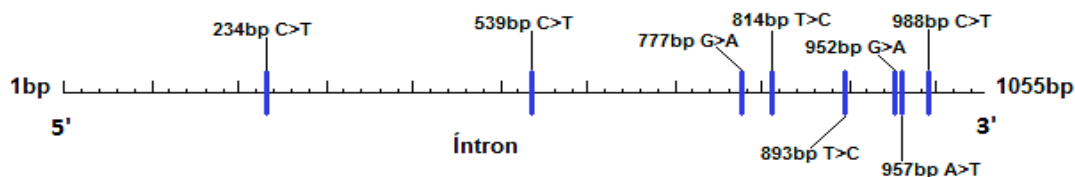


FIGURA 14 – SNPs identificados no *contig* do fragmento gerado com o *primer* runx2_p2 e suas respectivas posições

Com exceção da substituição C→T na posição 988bp, as demais substituições foram observadas somente em aves de corte. As mutações T→C na posição 893bp e A→T na posição 957bp apresentaram apenas uma ave de corte com o genótipo em heterozigose. As demais aves de ambas as linhagens apresentaram o mesmo genótipo homozigoto.

Para as outras mutações foram observados pelo menos dois dos três genótipos possíveis entre as aves da linhagem de corte. A frequência do alelo mutante para cada um dos SNPs detectados é mostrada na tabela 13.

TABELA 13 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* runx2_p2

| Posição (bp) | Alelo Consenso | Alelo Mutante | Frequência Alelo Mutante |
|--------------|----------------|---------------|--------------------------|
| 234 | C | T | 0,33 |
| 539 | C | T | 0,20 |
| 777 | G | A | 0,20 |
| 814 | T | C | 0,23 |
| 893 | T | C | 0,03 |
| 952 | G | A | 0,47 |
| 957 | A | T | 0,03 |
| 988 | C | T | 0,42 |

A análise das sequências amplificadas com o *primer* sost_p1 revelou a presença de cinco polimorfismos do tipo SNP, o que representa uma média de 0,57 SNP/ 100bp. Os SNPs identificados correspondem a transições, especialmente entre bases púricas, e estão todos localizados em região de íntron (Figura 15).

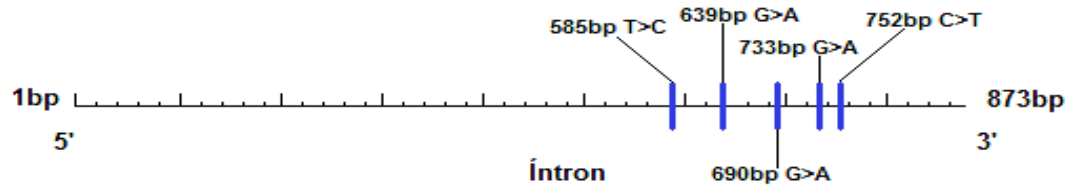


FIGURA 15 – SNPs identificados no *contig* do fragmento gerado com o *primer* sost_p1 e suas respectivas posições

As substituições T→C na posição 585bp e G→A na posição 639bp ocorreram apenas em homozigose entre as aves de postura. Na linhagem de corte tanto animais em homozigose como em heterozigose foram observados. Já a substituição C→T na posição 728bp ocorreu somente em homozigose entre as aves de corte, e em homozigose e heterozigose entre as aves de postura. Os demais SNPs apresentaram pelo menos dois dos três genótipos possíveis em ambas as linhagens. A frequência dos alelos mutantes para os SNPs identificados são mostrados na tabela 14.

TABELA 14 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* sost_p1

| Posição (bp) | Alelo Consenso | Alelo Mutante | Frequência Alelo Mutante |
|--------------|----------------|---------------|--------------------------|
| 585 | T | C | 0,03 |
| 639 | G | A | 0,13 |
| 690 | G | A | 0,30 |
| 733 | G | A | 0,30 |
| 752 | C | T | 0,17 |

Doze SNPs foram detectados após alinhamento das sequências amplificadas com o *primer* sost_p2. Os SNPs estão em sua maioria localizados em região de íntron (Figura 16) e ocorreram na média de 0,98 SNP/ 100bp. Entre as mutações detectadas, predominaram alterações envolvendo mudanças entre bases pirimídicas, em comparação com mudanças entre bases púricas e mutações do tipo “transversão”. Também foi identificado um polimorfismo do tipo *indel*, envolvendo a inserção de cinco nucleotídeos (ATTCC) em todas as amostras sequenciadas, em relação à sequência depositada no *GenBank*.

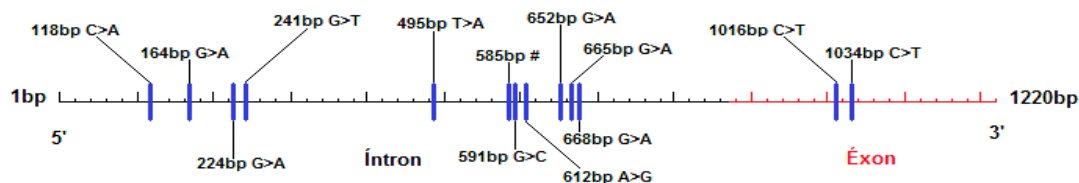


FIGURA 16 – Polimorfismos identificados no *contig* do fragmento gerado com o *primer* sost_p2 e suas respectivas posições

As substituições C→A na posição 118bp, G→A na posição 164bp, G→A na posição 224bp, T→A na posição 591bp, A→G na posição 612bp, G→A na posição 652bp, G→A na posição 665bp e C→T na posição 668bp ocorreram somente em aves da linhagem de postura. Já as substituições C→T na posição 1016bp e C→T na posição 1034bp foram observadas somente em animais da linhagem de corte, enquanto que a mutação T→A na posição 495bp foi detectada em aves de ambas as linhagens. A frequência dos alelos mutantes é mostrada na tabela 15.

TABELA 15 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os polimorfismos detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* sost_p2

| Posição (bp) | Alelo Consenso | Alelo Mutante | Frequência Alelo Mutante |
|--------------|----------------|-----------------------------|--------------------------|
| 118 | C | A | 0,125 |
| 164 | G | A | 0,12 |
| 224 | G | A | 0,12 |
| 241 | G | T | 0,12 |
| 495 | T | A | 0,25 |
| 585 | | Inserção ATTCC [#] | ^{##} |
| 591 | G | C | 0,07 |
| 612 | A | G | 0,11 |
| 652 | G | A | 0,11 |
| 665 | G | A | 0,11 |
| 668 | G | A | 0,14 |
| 1016 | C | T | 0,14 |
| 1034 | C | T | 0,07 |

[#] Não foi observado polimorfismo entre as amostras sequenciadas. O alelo mutante é descrito em relação à sequência depositada no *GenBank*

^{##} Frequência alélica não calculada

Entre as amostras amplificadas com o *primer* spp1_p3, onze SNPs foram identificados, o que corresponde a uma média de 1,44 SNPs/ 100bp. Destes, quatro estão localizados em região de éxon e sete em região de íntron. (Figura 17).

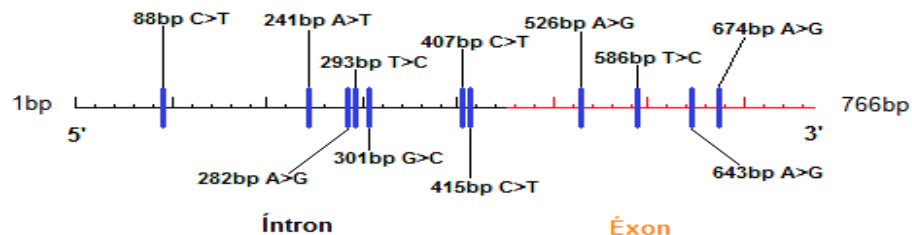


FIGURA 17 – SNPs identificados no *contig* do fragmento gerado com o *primer* spp1_p3 e suas respectivas posições

Entre os SNPs identificados, prevaleceram mutações envolvendo substituições entre bases pirimídicas em comparação a substituições entre bases púricas e mutações do tipo transversão. Estas mutações ocorreram principalmente em região de éxon. A substituição G→C na posição 301bp foi observada somente em aves da linhagem de corte, enquanto que as substituições A→G na posição 526bp, T→C na posição 586bp, A→G na posição 643bp e A→G na posição 674bp foram identificadas apenas em aves da linhagem de postura. Os demais SNPs foram observados em ambas as linhagens, com animais em homozigose como em heterozigose. A frequência do alelo mutante para os SNPs descritos é mostrada na tabela 16.

TABELA 16 – Posição, alelo consenso, alelo mutante e frequência do alelo mutante para os SNPs detectados no *contig* amplificado a partir do *primer* spp1_p3

| Posição (bp) | Alelo Consenso | Alelo Mutante | Frequência Alelo Mutante |
|--------------|----------------|---------------|--------------------------|
| 88 | C | T | 0,42 |
| 241 | A | T | 0,46 |
| 282 | A | G | 0,46 |
| 293 | T | C | 0,46 |
| 301 | G | C | 0,11 |
| 407 | C | T | 0,46 |
| 415 | C | T | 0,46 |
| 526 | A | G | 0,04 |
| 586 | T | C | 0,04 |
| 643 | A | G | 0,08 |
| 674 | A | G | 0,08 |

Benett *et al.* (2006) identificaram um SNP (C→A) localizado em região de íntron deste gene em aves, o qual demonstrou associação significativa com peso

corporal na quinta semana de vida. Já Allan *et al.* (2006) identificaram SNP no gene osteopontina de bovinos, o qual apresentou associação consistente com o peso em diferentes períodos de vida, entre os quais peso ao nascer e peso ao desmame.

A análise dos polimorfismos identificados nos fragmentos sequenciados demonstrou que mesmo estando sob forte seleção, às linhagens de corte (TT) e postura (CC) possuem grande variabilidade genética. Esta condição demonstra que estas linhagens podem ser realmente usadas como referência para estudos em genômica de aves, mesmo sendo de linhas puras e selecionadas por mais de 10 anos.

A caracterização e o conhecimento da diversidade genética de uma população são essenciais para que as descobertas genômicas possam ser aplicadas com sucesso na melhoria de características de interesse. A identificação de polimorfismos para serem usados como marcadores genéticos têm sido uma das principais maneiras de incorporar as descobertas genômicas ao melhoramento. Uma parcela considerável dos polimorfismos identificados neste trabalho tem potencial para serem avaliados quando ao uso como futuros marcadores genéticos, não somente para a seleção de aves com uma melhor estrutura óssea, como também para outras características de interesse econômico.

Outra linha de investigação, não menos importante, é a busca por *loci* para características quantitativas (QTLs). Regiões com efeitos significativos para características relacionadas à integridade óssea de aves, já foram identificadas nos cromossomos um (ZHOU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2010), dois, quatro, seis (ZHOU *et al.*, 2007), sete (LI *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2007) oito, nove, quatorze e dezessete (ZHOU *et al.*, 2007). Regiões com efeitos menos significados também já foram identificadas em outros cromossomos e poderão ser objeto de maior investigação em trabalhos futuros.

A análise de associação por meio de genes candidatos pode incrementar novas alternativas aos sistemas de melhoramento. O conjunto de pesquisas envolvendo o mapeamento de QTLs, busca por marcadores moleculares e estudos de expressão gênica irão contribuir para melhor compreender os mecanismos envolvidos nos processos de formação, reabsorção e manutenção da estrutura óssea de aves.

Embora existam instituições de pesquisa e universidades com excelentes linhas de pesquisa na área de genômica de aves, esforços em conjunto devem ser

estimulados, especialmente entre instituições nacionais para que as informações científicas sejam incorporadas com sucesso aos programas de melhoramento genético de aves.

4. CONCLUSÕES

- Polimorfismos de base única (SNP) foram identificados em amostras de nove dos dez pares de *primers* sequenciados, sendo que apenas o fragmento do gene para a proteína morfogenética óssea dois (*bmp2_p1*), apresentou sequência conservada nas amostras das linhagens de corte (TT) e de postura (CC) analisadas.
- Uma inserção de cinco nucleotídeos (ATTCC) foi observada em relação à sequência depositada no *GenBank* em todas as amostras sequenciadas para o gene *sost* (*primer sost_p2*).
- Foi observada elevada variabilidade genética nas linhagens de corte (TT) e postura (CC) sequenciadas, mesmo após anos de seleção intensiva.
- Os genes candidatos estudados apresentam polimorfismos que poderão ser investigados quanto à associação com características de integridade óssea.

5. REFERÊNCIAS

ALLAN, M. F.; THALLMAN, M.; CUSHMAN, R. A.; ECHTERNKAMP, S. E.; WHITE, S. N.; KUEHN, L. A.; CASAS, E.; SMITH, T. P. L. Association of single nucleotide polymorphism in *SSP1* with growth traits and twinning in a cattle population selected for twinning rate. **Journal of Animal Science**, v. 85, p.341-347, 2006.

ALMEIDA, E. A.; SILVA, C. S.; ALVES, H. J.; BERTANI, G. R.; LEDUR, M. C.; COUTINHO, L. L. Polimorfismos no gene alfa actina entre duas linhagens de aves (*Gallus gallus*). In: 51º Congresso Brasileiro de Genética - SBG. **Resumo...** Águas de Lindóia: SBG, p.96, 2005.

BENNETT, A. K.; HESTER, P. Y.; SPURLOCK, D. E. M. Polymorphisms in vitamin D receptor, osteopontin, insulin-like growth factor 1 and insulin, and their associations with bone, egg and growth traits in a layer – broiler cross in chickens. **Animal Genetics**, v.37, p.283-286, 2006.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.64-71, 2009.

CASSOLI, C. S. S.; JORGE, E. C.; PATRÍCIO, M.; ALVES, H. J.; ALMEIDA, E. A.; LEDUR, M. C.; COUTINHO, L. L. ESTs and putative line-specific (broiler and layer) SNPs identified in genes expressed in *Gallus gallus* pituitary and hypothalamus. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.4, p.1077-1081, 2007.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.

GARCIA, J. F. Utilização de Marcadores Moleculares para a Seleção. In: 2º Simpósio de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, 2006. **Anais...** Londrina, p. 195-201, 2006.

GORDON, D., ABAJIAN, C. & GREEN, P. *Consed*: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.; SUZUKI, D. T.; MILLER, J. H. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 2-22, 588-608 p.

HSU, Y.-H.; NIU, T.; TERWEDOW, H.; XU, X.; FENG, Y.; LI, Z.; BRAIN, J. D.; ROSEN, C. J.; LAIRD, N.; XU, X. Variation in genes involved in the the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. **Human Genetics**, v.118, p.568-577, 2006.

JEGO, Y. Perspectivas de Médio e Longo Prazo do Melhoramento Genético de Frangos de Corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos, **Anais...** Campinas: FACTA, 2008.

LEDUR, M. C; NONES, K.; ALVES, H. J.; BERTANI, G. R. A importância do conhecimento do genoma para a produção de aves. In: 41ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: 2004.

LEE, H.-J.; KOH, J.-M.; HWANG, J.-Y.; CHOI, K.-Y.; LEE, S. H.; PARK, E. K.; KIM, T.-H.; HAN, B. G.; KIM, G. S.; KIM, S.-Y.; LEE, J.-Y. Association of a RUNX2 Promoter Polymorphism with Bone Mineral Density in Postmenopausal Korean Women. **Calcif Tissue Int**, v. 84, p.439-445, 2009.

LEWIN, B. **Genes**. 8ª Ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2004. 10-19 p.

LI, H.; DEEB, N.; ZHOU, H.; MITCHELL, A. D.; ASHWELL, C. M.; LAMONT, S. J. Chicken Quantitative Trait Loci for Growth and Body Composition Associated with Transforming Growth Factor- β Genes. **Poultry Science**, v.82, p.347-356, 2003.

MELDRUM, D. Automation for Genomics, Part Two: Sequencers, Microarrays, and Future Trends. **Genome Research**, v.10, p.1288-1303, 2000.

MIR, L. *et al.*. **Genômica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.3-21 p.

NICKERSON, D. A.; TOBE, V. O.; TAYLOR, S. L. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.2745-2751, 1997.

NINOV, K. **Identificação de polimorfismos no gene da leptina e seu receptor em duas linhagens de aves e associação com características de desempenho e carcaça**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Laboratório de Biotecnologia Animal, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, v.5, p.223-241, 1996.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

ZHANG, H.; ZHANG, Y. D.; WANG, S. Z.; LIU, X. F.; ZHANG, Q.; TANG, Z. Q.; LI, H. Detection and fine mapping of quantitative traci loci for bone traits on chicken chromosome one. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.127, p.462-468, 2010.

ZHOU, H.; DEEB, N.; EVOCK-CLOVER, C.M.; MITCHELL, A. D.; ASHWELL, C. M.; LAMONT, S. J. Genome-Wide Linkage Analysis to Identify Chromosomal Regions Affecting Phenotypic Traits in the Chicken. III. Skeletal Integrity. **Poultry Science**, v.86, p.255-266, 2007.

WONG, G. K.; LIU, B.; WANG, J.; ZHANG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Z.; MENG, Q.; ZHOU, J.; LI, D.; *et al.* A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. **Nature**, v.432, n. 7018, p.717-722, 2004.

YAMADA, Y.; ANDO, F.; NIINO, N.; SHIMOKATA, H. Association of polymorphisms of the osteoprotegerin gene with bone mineral density in Japanese women but men. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.80, p.344-349, 2003.

CAPÍTULO II – IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES NOS GENES OPG E IBSP E SEUS EFEITOS SOBRE CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO, CARCAÇA E ESTRUTURA ÓSSEA EM UMA LINHAGEM PATERNA DE FRANGOS DE CORTE

Escrito seguindo as “Normas para a apresentação de documentos científicos”.
Universidade Federal do Paraná – Sistema de Bibliotecas. Curitiba: Ed. UFPR, 2007.

RESUMO

Os critérios de seleção em um programa de melhoramento devem garantir a renovação dos plantéis, sem que ocorra a seleção excessiva para algumas características em detrimento de outras. A seleção de aves com elevada taxa de crescimento, mas sem uma estrutura óssea adequada, resultou em aumentos na incidência de problemas locomotores. Neste trabalho foram selecionados dois SNPs identificados em genes envolvidos com o desenvolvimento do tecido ósseo. Os SNPs OPG G217C no gene osteoprotegerina e IBSP A211G no gene sialoproteína óssea foram genotipados por PCR-RFLP em 510 aves de uma população referência desenvolvida para estudos em genômica de aves, pela Embrapa Suínos e Aves. Os resultados foram avaliados pela análise da frequência genotípica e de variância no SAS. Ambos os SNPs demonstraram distribuição proporcional em relação ao sexo e incubação. A análise de associação foi feita no programa QxPaK v. 4.1 e os efeitos aditivo, dominante e aditivo + dominante testados, incluindo a interação com o sexo. O SNP OPG G217C apresentou associação significativa com o peso ao nascer ($P=0.107 \times 10^{-10}$), peso aos 21 ($P=0.004$), aos 35 ($p=0.04$) e aos 42 dias ($P=0.01$). Também foi observada associação com o peso das asas ($P=0.005$), peso do osso do peito ($P=0.02$) e resistência a flexão da tíbia ($P=0.05$). Os ganhos para a maioria das características foram explicados pelo efeito aditivo em decorrência da adição do alelo mutante C ao genótipo. Para o SNP IBSP A211G foi observada associação significativa com o peso aos 41 dias ($P=0.03$), peso do filé do peito ($P=0.006$), peso das asas ($P=0.01$), peso do osso do peito ($P=0.008$) e espessura da tíbia ($P=0.005$). Os ganhos foram explicados principalmente pelo efeito aditivo com influência do sexo, pela adição do alelo A ao genótipo. Algumas características associadas significativamente com o SNP IBSP A211G foram explicadas pelo efeito dominante com influência do sexo. Além destas, outras características de desempenho e carcaça apresentaram resultados significativos para os SNPs OPG G217C e IBSP A211G. A detecção de marcadores para o desenvolvimento do tecido ósseo e outras características de difícil avaliação pelos métodos tradicionais deverá contribuir para o aumento da eficiência da seleção em programas de melhoramento genético de aves.

Palavras chave: Osteoprotegerina. Sialoproteína óssea. Polimorfismos de nucleotídeo único. Genotipagem. *Gallus gallus*

ABSTRACT

The selection factors in a breeding program should ensure the renewal of herds, without the excessive selection for some traits in against others. Chicken selection to high growth rate, but without appropriate bone structure, resulted in an increase locomotor problems incidence. In this work we selected two SNPs, in two different genes involved on bone tissue development. The SNPs OPG G217C in osteoprotgerin gene and the IBSP A211G in bone sialoprotein gene, were genotyped by PCR-RFLP in 510 chickens from a reference population developed for studies in chicken genomics by Embrapa Swine and Poultry Research Center. The genotyping results were evaluated by analysis of genotypic frequencies and the variance on SAS. Both SNPs showed proportional distribution for sex and incubation. Association analysis was made in QxPaK v. 4.1 and the additive, dominant and additive + dominant effects were tested, including their interaction with sex. The SNP OPG G217C showed significant association with birth weight ($P=0.107 \times 10^{-10}$), weight at 21($P=0.004$), weight at 35 ($P=0.04$) and 42 days ($P=0.01$). Association was also observed with weight wings ($P=0.005$), weight breast bone ($P=0.02$) and bending resistance of tibia ($P=0.05$). The increase for the most traits can be explained by additive effect, with addition of the mutant allele C in the genotype. To SNP IBSP A211G significant association was observed to weight at 41 days ($P=0.03$), weight of breast fillet ($P=0.006$), wing weight ($P=0.01$), weight of breast bone ($P=0.008$) and thickness of the tibia ($P=0.005$). The increases can be explained especially by the additive effect influenciaded by the sex and involving the addition of A allele in the genotype. Some significative traits from the SNP IBSP A211G were explained by dominant effect influenced by the sex. In addition, other performance and carcass traits demonstrated significant results to the OPG G217C and the IBSP A211G SNPs. Marker detection for bone development and other hard traits evaluation by traditional methodologies should contribute to increase the efficiency in chicken selection and the breeding programs.

Keywords: Osteoprotegerin. Bone sialoprotein. Single nucleotide polymorphism. Genotyping. *Gallus gallus*

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético animal é um atividade que vem sendo desenvolvida há séculos. Mesmo antes dos conhecimentos envolvendo a genética moderna e a maneira como esta atua nas relações envolvendo o desenvolvimento dos seres vivos, o homem já procurava selecionar animais apenas com base no comportamento e nas características fenotípicas de interesse (SIEGEL *et al.*, 2006).

Nas últimas décadas, diferentes tecnologias têm sido incorporadas ao melhoramento animal (ALBERS *et al.*, 2008). No caso específico de aves, o uso de ferramentas moleculares e computacionais têm permitido uma seleção mais detalhada para as necessidades do mercado. Mesmo assim, é preciso que a seleção seja feita de maneira equilibrada, sem que algumas características sejam

extremamente priorizadas em detrimento de outras. A seleção para aves de desenvolvido rápido, porém sem estrutura óssea e desenvolvimento de órgãos adequados, são exemplos disso (ZHOU *et al.*, 2007).

Os problemas ósseos na criação de aves levam a perdas econômicas que vão desde o baixo desenvolvimento zootécnico (POWELL e BITTAR, 2008) até a morte prematura como consequência de problemas locomotores (COOK, 2000; RATH *et al.*, 2000). Os ossos são estruturas dinâmicas não estando limitados apenas a funções que envolvam resistência mecânica e suporte corporal. Também estão envolvidos em processos que envolvem a produção de elementos do sangue assim como na reserva de minerais (BARBOSA, 2005).

A seleção de aves com melhor estrutura óssea, por meio da seleção assistida por marcadores, pode ser uma das alternativas para reduzir os impactos que o inadequado desenvolvimento deste tecido pode gerar. O uso de marcadores na seleção animal já é uma realidade para algumas espécies (CAETANO, 2009). Em aves, no entanto, seu uso comercial está sendo implementado de forma estratégica. A principal razão é a facilidade de seleção pelos métodos tradicionais, já que aves são animais de pequeno porte e com rápido ciclo reprodutivo, o que facilita avaliação do fenótipo para que parâmetros genéticos sejam estimados.

Apesar disso, a identificação de marcadores moleculares para características de difícil seleção pelos métodos tradicionais tem estimulado o interesse na busca de soluções por meio da genômica. Por isso, é possível que nos próximos anos, os programas de melhoramento de aves já estejam fazendo uso considerável destas descobertas para a melhoria de seus plantéis (LEDUR *et al.*, 2011).

Neste trabalho foram genotipados dois SNPs, um no gene osteoprotegerina e outro na sialoproteína óssea, com o objetivo de identificar marcadores moleculares que possam estar direta ou indiretamente associados à características envolvidas com a estrutura óssea em aves.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. População referência TT

A população referência TT foi desenvolvida para a validação de resultados de pesquisas em genômica de aves e descoberta de genes (PEIXOTO *et al.*, 2010). Esta população foi obtida pela expansão da linhagem paterna de frango de corte TT, pertencente ao Programa de Melhoramento Genético de Aves da Embrapa Suínos e Aves. Ela foi formada pelo cruzamento de 20 machos TT com 92 fêmeas TT na proporção de 1:5 respectivamente, totalizando 1453 descendentes (Tabela 1). Os animais foram criados como frangos de corte seguindo programas de vacinação, nutrição e manejo preconizados pela Embrapa Suínos e Aves.

TABELA 1 – Estrutura da população referência TT

| Geração | Machos | Fêmeas | Total |
|-------------------------|--------|--------|-------|
| Parentais | 20 | 92 | 112 |
| População referência TT | 699 | 754 | 1453 |

As aves desta população foram mantidas em boxes coletivos até 35 dias de idade, e dos 35 aos 41 dias de idade foram alojadas em gaiolas individuais para a avaliação da conversão alimentar. Os animais foram identificados por meio de anéis metálicos com o número para controle do *pedigree*, e receberam ração inicial do 1º ao 21º dia (21% de proteína bruta e 3.150 Kcal de energia metabolizável), ração de crescimento do 22º ao 35º dia (20% de proteína bruta e 3.200 Kcal de energia metabolizável) e ração final do 31º ao 41º dia (18,5% de proteína bruta e 3.200 Kcal de energia metabolizável). Aos 42 dias de idade as aves foram pesadas e abatidas após jejum pré abate de 6 horas, e realizada a medição de várias características de desempenho e carcaça, assim como a coleta de material biológico e de sangue para extração de DNA.

2.2. Coleta de dados fenotípicos de desempenho e carcaça

Foram coletados dados de ganho de peso em diferentes períodos de vida, assim como de conversão alimentar e ganho de peso dos 35 aos 41 dias (Tabela 2).

TABELA 2 – Características avaliadas entre o nascimento e o abate

| Características | |
|---------------------------|------------------------|
| Ganho de peso (GP3541) | Peso aos 21 dias (P21) |
| Consumo de ração (CR3541) | Peso aos 35 dias (P35) |
| Conversão alimentar (CA) | Peso aos 41 dias (P41) |
| Peso ao nascer (PNAS) | Peso aos 42 dias (P42) |

Após o abate, as carcaças foram evisceradas e os pesos do coração (COR), fígado (FIG), pulmões (PUL) e moela (MO) avaliados. Depois de quatro horas de resfriamento foram avaliados os pesos de carcaça e partes (Tabela 3). O peso da carcaça foi medido após remoção da cabeça, pés, vísceras, sangue e penas.

TABELA 3 – Características de carcaça e partes avaliadas após quatro horas de resfriamento

| Características de carcaça e partes | | |
|-------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Peso da carcaça (PCR) | Coxas (CX) | Meio das asas (MASA) |
| Cabeça (CAB) | Pés (PES) | Carne coxas (CARCX) |
| Pescoço (PESC) | Gordura abdominal (GA) | Carne sobre coxas (CARSCX) |
| Peito (PT) | Sobre coxas (SCX) | Carne de peito (CARPT) |
| Asas (ASA) | Coxa das asas (CASA) | Filé de peito (FILPT) |

Algumas características como peso da carcaça após sangria e depena (PPSD), peso da pele da coxa (PELCX), pele da sobre coxa (PELSCX), pele do peito (PELPT), osso do peito (OSPT) são características pouco convencionais de serem medidas. Porém, essas medidas fracionadas dos cortes podem melhorar o entendimento da arquitetura genética que governa o desenvolvimento do frango de corte. Também foi avaliado o peso do fêmur (PFEM), da tíbia (PTIB) e peso do dorso (DORS).

Os rendimentos dos cortes foram calculados pela divisão do peso da característica em questão, pelo peso do frango vivo aos 42 dias de idade. O valor obtido foi multiplicado por 100 para ter o resultado em porcentagem (%) (Tabela 4).

TABELA 4 – Características de rendimento avaliadas

| Características de rendimento | | |
|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Carcaça (RPCR) | Carne coxas (RCARCX) | Fígado (RFIG) |
| Gordura abdominal (RGA) | Sobre coxas (RSCX) | Pulmão (RPUL) |
| Cabeça (RCAB) | Carne sobre coxas (RCARSCX) | Osso do peito (ROSPT) |
| Pés (RPES) | Peito (RPT) | Tíbia (PTIB) |
| Pescoço (RPESC) | Carne do peito (RCARPT) | Fêmur (PFEM) |
| Asas (RASA) | Filé do peito (RFILPT) | Pele coxas (PELCX) |
| Meio das asas (RMASA) | Dorso (RDORS) | Pele sobre coxas (PELSCX) |
| Coxa das asas (RCASA) | Coração (RCOR) | Pele do peito (PELPT) |
| Coxas (RCX) | Moela (RMO) | |

Foram realizadas análises exploratórias nos dados fenotípicos utilizando o programa SAS (2008). Nessas avaliações foram eliminados dados discrepantes e identificados efeitos fixos significativos, para que estas informações pudessem ser usadas nas análises de associação entre o genótipo dos SNPs e as características fenotípicas.

2.3. Aspectos físicos e mecânicos dos ossos

2.3.1. Peso, comprimento e espessura da tíbia e fêmur

Para a avaliação dos parâmetros físicos, os ossos do fêmur e da tíbia de aves da população referência TT, que estavam armazenados a -20°C foram acondicionados a temperatura de 0°C por 24 horas. Em seguida, o excesso de carne, gordura e cartilagem foi removido manualmente e os ossos avaliados quanto ao peso úmido, comprimento entre as extremidades e espessura na região mediana. Também foi estabelecido um *score* variando entre um (ossos retos) e dois (ossos curvados) para avaliar visualmente o grau de curvatura do fêmur. Foram avaliadas

cerca de 1100 aves e após as medições, os ossos foram acondicionados em sacos plásticos, identificados com o número do indivíduo e armazenados a temperatura de -20°C.

2.3.2. Ensaio de flexão

Para determinação da resistência a flexão, os ossos do fêmur e da tíbia de aves da população referência TT foram acondicionados a temperatura de aproximadamente 0°C por 48 horas e em seguida deixados a temperatura ambiente por cerca de uma hora.

O ensaio de flexão foi realizado na máquina TA – *XTPlus Texture Analyzer* ©Texture Technologies Corporation, usando a *probe* TA-92©Texture Technologies Corporation. Os ossos foram acomodados na mesma posição, com as extremidades apoiadas em dois suportes afastados a 30 mm e 40 mm para os ossos do fêmur e tíbia, respectivamente.

À distância percorrida pela *probe* após o toque na amostra foi de 20 mm com velocidade de teste de 2,00 mm/s, velocidade de pré teste de 2,00 mm/s e velocidade de pós teste de 20,00 mm/s. A força peso com que a *probe* tocava na amostra, programada no equipamento foi de 0.0050 Kg. Esta força foi aplicada na região central (diáfise) e a resistência a flexão ou módulo de ruptura determinado. Após o rompimento, os fragmentos ósseos foram acondicionados em sacos plásticos, identificados com o número da amostra e armazenados a 0°C por aproximadamente 24 horas para posterior análise de matéria seca e cinzas.

2.4. Aspectos químicos dos ossos

2.4.1. Matéria Seca

Para determinação da porcentagem de matéria seca, os fragmentos ósseos que estavam a 0°C foram mantidos a temperatura ambiente por cerca de uma hora, acondicionados em cadinhos de porcelana previamente pesados e deixados em estufa à temperatura de 105°C por aproximadamente 16 horas.

Após, os cadinhos contendo as amostras foram mantidos no dessecador até atingirem temperatura ambiente e em seguida pesados. A porcentagem de matéria

seca foi determinada pelo peso da amostra seca multiplicado por 100% e o resultado dividido pelo peso da amostra úmida.

2.4.2. Determinação de Cinzas

A determinação da porcentagem de cinzas foi realizada com os fragmentos ósseos logo após matéria seca. As amostras foram incineradas em mufla por aproximadamente seis horas. A temperatura máxima da mufla foi atingida com aumentos graduais. Inicialmente 350°C por cerca de uma hora, 450°C por uma hora, 550° por uma hora e 600°C por aproximadamente três horas.

Após, os cadinhos contendo as amostras foram deixados no dessecador até atingirem a temperatura ambiente e em seguida pesados. A porcentagem de cinzas foi determinada pelo peso das cinzas multiplicado por 100%, e o resultado dividido pelo peso da amostra úmida. As cinzas foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas com o número do indivíduo e armazenadas em ambiente com baixa umidade.

2.5. Coleta de sangue

A coleta de sangue para extração de DNA foi realizada durante a sangria no momento do abate. Aproximadamente 2 mL de sangue foram coletados da jugular e armazenados em tubo do tipo *ependorf* de 2 mL que já continha 100µL (10% v.v.) do anticoagulante EDTA 0,5M. Durante a coleta as amostra eram acondicionadas em gelo, e após a coleta foram armazenadas em freezer a -20°C.

2.6. Extração de DNA

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de extração com o reagente DNAzol (*Invitrogen*). As amostras de sangue foram descongeladas a temperatura ambiente e homogeneizadas manualmente.

Foram adicionados 500 µL de DNAzol, a 15µL de sangue conservado em EDTA 0,5M, seguido de homogeneização manual e em aparelho vórtex até que o sangue diluísse totalmente no reagente. Após, foi adicionado 500 µL de etanol absoluto e os tubos contendo as amostras foram cuidadosamente invertidos várias

vezes. O precipitado foi removido do tubo com auxílio de um micropipetador, o sobrenadante descartado e o *pellet* transferido de volta para o mesmo tubo.

Em seguida foram feitas duas lavagens usando o mesmo procedimento descrito acima. Na primeira foram adicionados 1000 µL de etanol 95% e na segunda 1000 µL de etanol 75%.

Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e o *pellet* desidratado a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida foi ressuspendido em 150 µL de H₂O ultra pura, incubado a 37°C por 1 hora em banho maria e armazenado em freezer a -20°C até seu uso.

2.7. Quantificação e diluição do DNA

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (*Eppendorf BioPhotometer*) a 260 nm. Inicialmente o aparelho foi ajustado (branco) pela adição de 10 µL de H₂O ultra pura. Para determinação da quantidade de DNA, eram aplicadas na cubeta de leitura 7 µL H₂O ultra pura, seguido de 3 µL da amostra. Após a quantificação as amostras foram diluídas em H₂O ultra pura para a concentração de 25 ng/ µL, acondicionadas em placas de 96 poços e armazenadas em freezer a -20°C. Depois de diluídas, algumas amostras foram escolhidas aleatoriamente e aplicadas em gel de agarose 1%, para confirmar a concentração observada no aparelho espectrofotômetro e verificar quanto à integridade do DNA extraído.

2.8. Genotipagem

Dois SNPs identificados nos genes para a osteoprotegerina (OPG G217C) e sialoproteína óssea (IBSP A211G) amplificados pelos *primers* opg_p1 e ibsp_p2, respectivamente, foram selecionados e genotipados pela técnica de PCR-RFLP. O procedimento envolveu reação de PCR seguida de clivagem com enzima de restrição específica. Para cada SNP foram genotipadas 510 aves da população referência TT. As aves genotipadas não foram necessariamente às mesmas para os dois SNPs avaliados, uma vez que, com base em informações do *pedigree* da população, foram selecionadas ao acaso aves provenientes de cruzados que permitissem obter um número razoável para cada um dos três genótipos possíveis de cada SNP.

2.8.1. Reação de PCR

Na reação de PCR usada para amplificar o fragmento correspondente ao *primer* opg_p1, adicionou-se: 3,0 µL de DNA genômico na concentração de 25 ng/µL a 22 µL do mix contendo: 2,5 µL de tampão 10X, 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTP (10 mM), 2,5 µL do *primer* direto (2 pmol/µL), 2,5 µL do *primer* reverso (2 pmol/µL), 0,3 µL da enzima *Taq DNA Polimerase, Invitrogen* (5U/µL) e completado com H₂O ultra pura para volume final de 25 µL.

Para o *primer* ibsp_p2, alterações na temperatura de anelamento, concentração de MgCl₂ e de DNA genômico se fizeram necessário. Os demais componentes da reação de PCR foram empregados nas mesmas quantidades e concentrações que os usados para o *primer* opg_p1 acima descritos.

As condições programadas no aparelho termociclador para o *primer* opg_p1 envolveram as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, 35 ciclos de três minutos, sendo um minuto para cada sub etapa de desnaturação, anelamento e extensão a 95°C, 59°C e 72°C respectivamente, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Para o *primer* ibsp_p2, com exceção da temperatura de anelamento que foi de 58°C, as demais temperaturas e condições programadas no aparelho termociclador foram às mesmas.

A amplificação dos fragmentos desejados foi realizada pela aplicação de 3,0 µL de cada amostra em gel de agarose 1%, corado com 0,01% de brometo de etídeo e acompanhadas do marcador padrão de peso de DNA molecular 1 Kb (1 Kb DNA Ladder – *Promega Corporation*). O gel foi submetido à corrente elétrica de 80 V por aproximadamente 50 minutos em TBE 1X (Tris–Borato–EDTA) e observado em transluminador ultravioleta. A amplificação foi confirmada pela comparação entre a banda de cada amostra e o padrão de peso de DNA molecular 1 Kb.

2.8.2. Reação de clivagem

Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas à reação de clivagem com enzima de restrição específica. O critério de seleção dos polimorfismos (SNP) para a genotipagem foi feito com base na ocorrência e distribuição dos mesmos nas duas linhagens sequenciadas. A identificação dos sítios de restrição e a seleção de

uma enzima que reconhecesse o polimorfismo selecionado, foi realizada no programa *NEBcutter* (VINCZE et al., 2003).

Cada enzima foi usada para avaliar um SNP, de um fragmento em específico, sendo a enzima *Bsr I* selecionada para avaliação do SNP do fragmento amplificado pelo *primer* opg_p1, enquanto que a enzima *Hpa II* foi selecionada para a análise do SNP no fragmento amplificado pelo *primer* ibsp_p2. Ambas foram diluídas para a concentração de 1U/ μ L em seus respectivos tampões de diluição especificados pelo fabricante (Apêndice A).

Devido a variações na intensidade da amplificação entre as amostras, diferentes volumes do produto de PCR foram empregados para a reação de clivagem com a enzima de restrição *Hpa II*. Já para a enzima *Bsr I*, os volumes do produto amplificado usados na reação de clivagem foram os mesmos. Abaixo são descritas as condições de clivagem para cada uma delas:

⇒ *Bsr I*: A cada reação adicionou-se 13 μ L do produto de PCR a 11 μ L do mix contendo: 1,5 μ L do tampão 10X; 1,0 μ L da enzima *Bsr I* 1U/ μ L e o volume foi completado com H₂O ultra pura para um volume final de 25 μ L. As condições programadas no termociclador envolveram as seguintes etapas: um ciclo a 65°C por três horas e meia, seguida de um ciclo a 80°C por 20 minutos.

⇒ *Hpa II*: A cada reação adicionou-se de 4,0 μ L a 10,0 μ L do produto de PCR ao mix contendo: 2,5 μ L do tampão 10X; 1,25 μ L da enzima *Hpa II* a 1U/ μ L e o volume foi completado com H₂O ultra pura para um volume final de 25 μ L. A reação ocorreu em banho maria a temperatura de 37°C *over night*.

Em seguida, um volume variando entre 15 μ L a 20 μ L de cada amostra foi aplicado em gel de agarose 1%, corado com 0,01% de brometo de etídeo. As amostras foram aplicadas no gel, juntamente com o marcador de DNA molecular 100 pb (100 bp DNA *Ladder* – *Promega Corporation*) e submetidas à corrente elétrica de 100 V por aproximadamente uma hora e meia em TBE 1X (Tris–Borato–EDTA). Os géis foram observados em transluminador ultravioleta e o genótipo de cada indivíduo foi determinado pelo padrão de bandas observado em cada amostra, e sua comparação com o tamanho de bandas do marcador padrão de peso de DNA molecular 100 pb (100 bp DNA *Ladder* – *Promega Corporation*).

2.9. Análise Estatística

2.9.1. Frequência genotípica

Para cada um dos SNPs genotipados foi realizada a análise da frequência genotípica no programa PROC FREQ do SAS (2008). A frequência foi calculada considerando a equação geral:

$$\eta_{BB} + \eta_{Bb} + \eta_{bb} = 1$$

Com: $N_{BB} + N_{Bb} + N_{bb} = N$, $\eta_{BB} = N_{BB}/N$, $\eta_{Bb} = N_{Bb}/N$, $\eta_{bb} = N_{bb}/N$ em que:

N : representa o número total de animais, N_{BB} , N_{Bb} , N_{bb} : representam o número de animais de cada genótipo e η_{BB} , η_{Bb} , η_{bb} : representam a frequência genotípica relativa para cada um dos genótipos.

2.9.2. Análises descritivas e de variância

As análises descritivas e de variância foram realizadas nos programas *Microsoft Excel* e SAS (2008) respectivamente. Na análise descritiva foi calculado o valor médio, desvio padrão e o valor máximo e mínimo para cada característica fenotípica. O Teste F do SAS (2008) foi usado para análise da variância dos animais genotipados e avaliação dos efeitos de incubação, família, sexo, genótipo e interação genótipo e sexo. Os valores de probabilidade foram considerados altamente significativos (**) quando $P < 0.01$, significativos (*) quando $P < 0.05$ e sugestivos (†) quando $P < 0.10$.

2.9.3. Análises de associação

As análises de associação entre os SNPs e características fenotípicas foram realizadas no programa QxPak v. 4.1 (PEREZ-ENCISO & MISZTAL, 2004) que utiliza procedimentos de máxima verossimilhança e também de modelos mistos. Foram incluídos os efeitos fixos de incubação (I), sexo (S) e do SNP, assim como os efeitos aleatórios do animal (a) e do erro associado ao modelo (e), através do seguinte modelo linear:

$$y_{ijklm} = \mu + a_{ijkl} + I_i + S_k + SNP_l + e_{ijklm} \text{ onde:}$$

y_{ijklm} = representa o valor do fenótipo da característica; μ = média geral da característica; I_i = efeito fixo da $i^{\text{ésima}}$ incubação (com $i=1...5$); a_{ijkl} = efeito aleatório do $j^{\text{ésimo}}$ animal do sexo k da incubação i ($j= 1...510$); S_k = efeito fixo do $k^{\text{ésimo}}$ sexo ($k = 1, 2$); SNP_l = efeito fixo do $l^{\text{ésimo}}$ genótipo ($l = 11, 12, 22$); e_{ijklm} = erro aleatório. Neste modelo foram avaliados os efeitos aditivo (Ad), aditivo + dominante (Ad + Do) e dominante (Do) do SNP. Após, esses modelos foram ajustados considerando a interação com o sexo, o que permitiu avaliar se o SNP apresenta efeito diferente em relação a machos e fêmeas na população referência TT. Após a avaliação dos três modelos, os valores de probabilidade estimados no QxPak v. 4.1 foram considerados altamente significativos (**) quando $P < 0.01$, significativos (*) quando $P < 0.05$ e sugestivos (†) quando $P < 0.10$.

Como o programa QxPak v. 4.1 não fornece a média estimada para cada genótipo, mas apenas o efeito em relação ao alelo, estas foram calculadas no SAS, pela média dos mínimos quadrados, para facilitar a interpretação dos resultados. Gráficos com as médias estimadas foram plotados, e o comportamento aditivo ou de dominância/ sobredominância observado para algumas características.

Para as características em que os resultados foram explicados pelo efeito aditivo, curvas de tendência linear foram traçadas e o valor de R^2 calculado. Esta condição foi usada para confirmar o perfil de linearidade esperado nas ocasiões em que os resultados são explicados fortemente pelo efeito aditivo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Extração, quantificação e diluição de DNA

As amostras de DNA foram extraídas usando o reagente DNAzol (*Invitrogen*). Os resultados obtidos pela extração com este reagente foram bons. Tanto a relação entre as absorbâncias A_{260}/A_{280} usada para avaliar o grau de pureza de uma amostra, como a visualização do material aplicado em gel de agarose 1%, demonstraram que o DNA extraído apresentava pureza apropriada, com valores para a relação A_{260}/A_{280} que variaram de 1,7 e 1,9 (Figura 1).

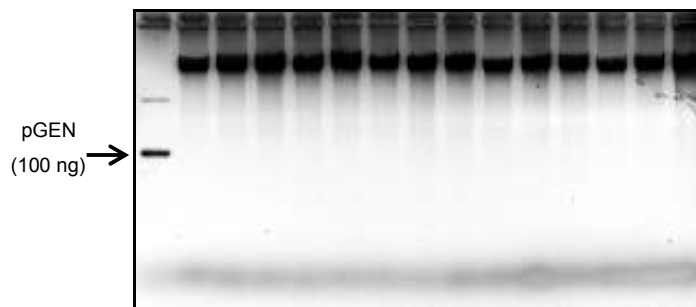


FIGURA 1 – Amostras extraídas com o reagente DNAzol e aplicadas em gel de agarose 1%, acompanhadas do marcador de peso molecular (plasmídeo pGEN – 25ng/ μ L)

Os resultados da diluição do DNA para a concentração de 25ng/ μ L, revelaram uma pequena diferença na concentração entre as amostras (Figura 2).

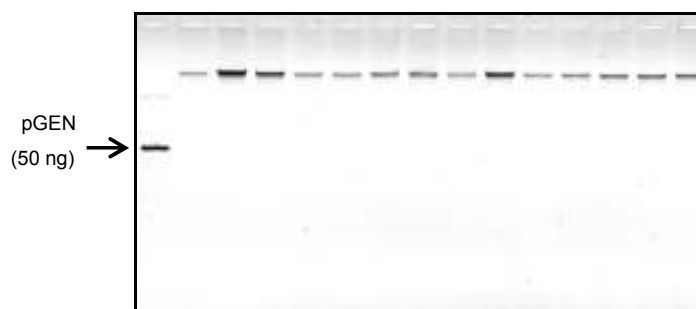


FIGURA 2 – Amostras após diluição com H₂O ultra pura, aplicadas em gel de agarose 1% e acompanhadas do marcador de peso molecular (plasmídeo pGEN – 25ng/ μ L)

Estas variações de concentração muito provavelmente se devem a pequenos erros de manipulação, associado à “baixa” reprodutibilidade do equipamento usado para quantificação. Estes resultados, no entanto, não chegam a comprometer seu uso para reações de PCR.

3.2. Genotipagem

Os SNPs OPG G217C na posição 217bp e IBSP A211G na posição 211bp, amplificados pelos *primers* opg_p1 (osteoprotegerina) e ibsp_p2 (sialoproteína óssea) respectivamente, foram selecionados para a genotipagem em 510 aves da população referência TT. Os principais critérios envolvidos na seleção dos SNPs

foram à ocorrência dos mesmos nos indivíduos informativos sequenciados, assim como a existência de uma enzima de restrição cujo sítio de clivagem permitisse a distinção dos diferentes genótipos em gel de agarose.

3.2.1. Genotipagem do SNP OPG G217C

As condições de amplificação por PCR para as amostras da população TT, foram às mesmas usadas nas linhagens de corte e postura sequenciadas. Apesar de variações na magnitude do produto amplificado (Figura 3), muito possivelmente em virtude de diferenças na concentração do DNA, estas não foram suficientes para que mudanças se fizessem necessárias.

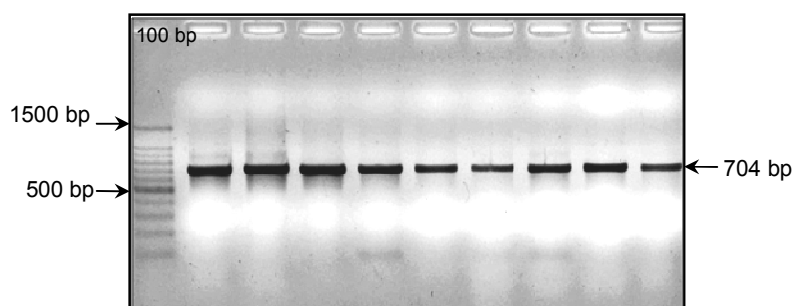


FIGURA 3 – Amostras da população referência TT amplificadas com o *primer* opg_p1 e aplicadas em gel de agarose 1%

Após amplificação, as amostras foram clivadas com a enzima *Bsr I* (Figura 4). A análise de restrição feita no programa *NEBcutter* revelou a presença de seis sítios de clivagem ao longo da sequência de 704bp. De acordo com resultados da análise, após a digestão são gerados fragmentos de 321bp, 138bp, 76bp, 75bp, 55bp, 22bp e 17bp na presença do alelo G, enquanto que a ocorrência do alelo C no sítio polimórfico produziria fragmentos de 397bp, 138bp, 75bp, 55bp, 22bp e 17bp.

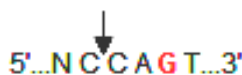


FIGURA 4 – Sequência de nucleotídeos reconhecida pela enzima *Bsr I*, com destaque para o sítio polimórfico em vermelho

O perfil de bandas obtido no programa *NEBcutter* foi confirmado pela reação de clivagem com a enzima. As condições inicialmente avaliadas foram conduzidas

seguindo recomendações do fabricante. Adicionou-se 13 µL do produto de PCR a 12 µL do mix contendo: enzima, tampão e H₂O ultra pura para um volume final de 25 µL (Tabela 5). As condições de clivagem programadas no termociclador envolveram as etapas de clivagem a 65°C por três horas e meia, seguida de inativação da enzima a 80°C por 20 minutos.

TABELA 5 – Volumes e concentrações dos reagentes usados na reação de clivagem com a enzima *Bsr I*

| Reagente | Volume (µL) | Concentração Inicial | Concentração final |
|-----------------------------|-------------|----------------------|--------------------|
| Enzima <i>Bsr I</i> | 1,0 | 1U/ µL | 0,04 U/ µL |
| Tampão | 1,5 | 10X | 0,6X |
| DNA PCR | 13,0 | | |
| H ₂ O ultra pura | 9,5 | | |

Na reação de clivagem os três genótipos foram facilmente identificados, além do que, foi observada pequena quantidade de fragmentos com digestão parcial, o que reforça a condição adequada usada na reação de clivagem (Figura 5).

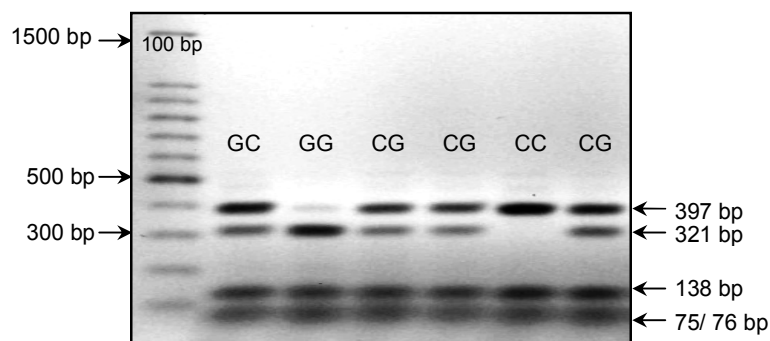


FIGURA 5 – Amostras de aves da população referência TT após clivagem com a enzima *Bsr I*, aplicadas em gel de agarose 1%

3.2.2. Genotipagem do SNP IBSP A211G

As condições de amplificação usadas nas amostras das linhagens de corte (TT) e postura (CC) sequenciadas não demonstraram bons resultados na população referência TT (amostras A, B, C, D, E, F, G e H). Não foi observado um perfil homogêneo (Figura 6), muito provavelmente como consequência de diferenças na

concentração de DNA, associado a uma baixa magnitude na amplificação do fragmento de 809 bp.

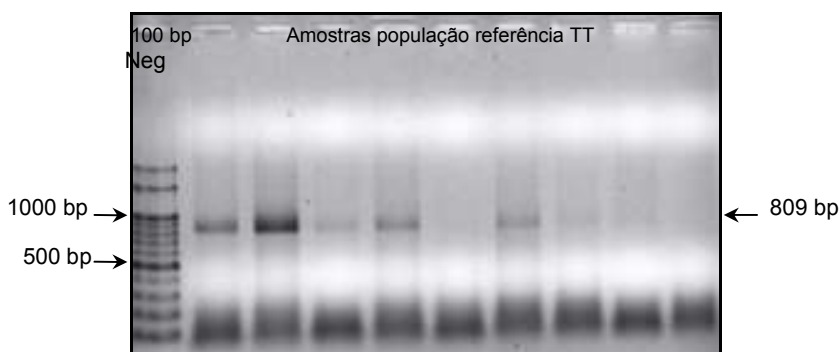


FIGURA 6 – Amostras da população referência TT, amplificadas a partir do primer *ibsp_p2* e aplicadas em gel de agarose 1%

Embora as amostras tenham sido manipuladas com os mesmos protocolos de extração, quantificação e diluição, problemas na reprodutibilidade do equipamento usado para a quantificação, podem ter contribuído para estes resultados. Este mesmo comportamento foi observado em amostras amplificadas com o *primer* *opg_p1*, embora com uma menor intensidade.

Variações na magnitude de fragmentos amplificados por PCR são comuns em ocorrências nas quais amostras, reagentes ou mesmo equipamentos sejam diferentes ou realizados em outros laboratórios. Muito constantemente em procedimentos desta natureza, pequenas alterações em parâmetros como temperatura de anelamento e concentração de magnésio são necessárias na padronização de uma reação sob diferentes condições.

Para este caso em específico, variações na concentração de $MgCl_2$, temperatura de anelamento do *primer* e concentração de DNA foram necessárias.

3.2.2.1. Alterações na concentração de $MgCl_2$ e temperatura de anelamento

Alterações na concentração de $MgCl_2$ de 2,0mM/ μ L para 2,5mM/ μ L, e na temperatura de anelamento de 59°C para 58°C e 60°C foram avaliadas usando duas amostras de DNA (Figura 7). As demais condições não foram alteradas.

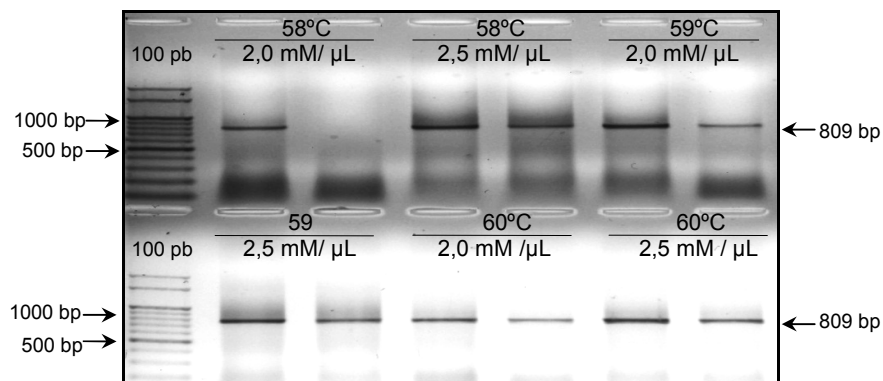


FIGURA 7 – Avaliação das condições de amplificação sob diferentes concentrações de $MgCl_2$ e temperaturas de anelamento, em amostras da população referência TT aplicadas em gel de agarose 1%

As variações na concentração de $MgCl_2$ e temperatura de anelamento demonstraram resultados promissores para diferentes condições avaliadas. Foi observado maior eficiência na amplificação do fragmento de 809bp em ocasiões nas quais a concentração de $MgCl_2$ era maior. Por outro lado, variações na temperatura de anelamento não resultaram em mudanças significativas na capacidade de amplificação. Também não foram notados fragmentos inespecíficos capazes de comprometer os resultados em nenhuma das reações avaliadas. Considerando ambas as variáveis, as condições que demonstraram melhor qualidade de amplificação foram as reações usando $MgCl_2$ a 2,5mM/ μL e temperatura de 58°C.

3.2.2.2. Alterações na concentração de DNA genômico

Alterações na concentração de DNA genômico (Tabela 6) foram testadas para avaliar o comportamento do aumento de DNA na reação. As condições programadas no termociclador envolveram as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, 35 ciclos de três minutos, sendo um minuto para cada sub etapa de desnaturação, anelamento e extensão a 95°C, 58°C e 72°C respectivamente, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

TABELA 6 – Volumes e concentrações dos componentes usados na reação de PCR

| Reagente | Teste 1 (Concentração Final) | Teste 2 (Concentração Final) |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Tampão | 1 x | 1 x |
| dNTPs | 0,04mM | 0,04mM |
| MgCl ₂ | 2,5mM | 2,5mM |
| Primer R | 0,2 pmol/ µL | 0,2 pmol/ µL |
| Primer F | 0,2 pmol/ µL | 0,2 pmol/ µL |
| <i>Taq polimerase</i> | 0,06 U/ µL | 0,06 U/ µL |
| DNA | 4,0 ng/ µL | 3,0 ng/ µL |
| H ₂ O ultra pura | | |

O aumento na concentração de DNA genômico produziu efeitos positivos, sem interferir negativamente em amostras que já estavam amplificando (A, B e D). Pode se ressaltar também o aumento na intensidade de amplificação das amostras C, G e H em comparação a primeira avaliação (Figura 8).

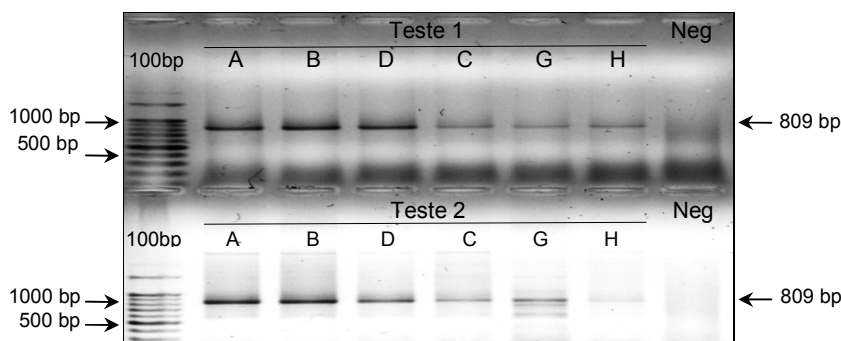


FIGURA 8 – Avaliação das condições de amplificação com diferentes concentrações de DNA genômico, aplicadas em gel de agarose 1%

Após avaliações com variações na concentração de MgCl₂, DNA genômico e alterações na temperatura de anelamento, as melhores condições observadas para as amostras da população referência TT foram: reação de PCR com desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, 35 ciclos de três minutos, sendo um minuto para cada sub etapa de desnaturação, anelamento e extensão a 95°C, 58°C e 72°C respectivamente, e extensão final a 72°C por 10 minutos. A concentração ideal dos componentes para a reação de PCR está apresentada na tabela 7.

TABELA 7 – Volumes e concentrações dos componentes usados na reação de PCR com o *primer* ibsp_p2 em amostras da população referência TT

| Reagente | Volume (µL) | Concentração | Concentração final |
|-----------------------------|-------------|--------------|--------------------|
| Tampão | 2,5 | 10 X | 1 X |
| dNTPs | 1,0 | 10 mM | 0,04mM |
| MgCl ₂ | 1,25 | 50 mM | 2,5mM |
| Primer R | 2,5 | 2,0 pmol/ µl | 0,2 pmol/ µl |
| Primer F | 2,5 | 2,0 pmol/ µl | 0,2 pmol/ µl |
| <i>Taq</i> polimerase | 0,3 | 5U/ µl | 0,06 U/ µl |
| DNA | 4,0 | 25 ng/µl | 4,0 ng/ µl |
| H ₂ O ultra pura | 12,2 | | |

Posteriormente as amostras foram clivadas com a enzima *Hpa II* (Figura 9). A análise de restrição feita no programa *NEBcutter* revelou a presença de dois sítios de clivagem. De acordo com esse programa, após a digestão seriam gerados fragmentos de 670bp e 139bp na presença do alelo A, enquanto que a ocorrência do alelo G produziria fragmentos de 600bp, 139bp e 70bp.



FIGURA 9 – Sequência de nucleotídeos reconhecida pela enzima *Hpa II*, com destaque para o sítio polimórfico em vermelho

O perfil de bandas gerado pela simulação feita no programa *NEBcutter*, foi confirmado pela reação de clivagem com a enzima. Foram adicionados de 4,0 µL a 10,0 µL da reação de PCR ao mix contendo enzima, tampão e completado com H₂O ultra pura para um volume final de 25 µL (Tabela 8). A reação ocorreu em “banho maria” a temperatura de a 37°C *over night* (ou por aproximadamente 16 horas).

TABELA 8 – Volumes e concentrações dos reagentes usados na reação de clivagem com a enzima *Hpa II*

| Reagente | Volume | Concentração final |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|
| Enzima <i>Hpa II</i> | 1,25 µL | 0,05 U/ µL |
| Tampão | 2,5 µL | 1X |
| DNA PCR | 4,0 µL a 10,0 µL | |
| H ₂ O ultra pura | 11,25 µL a 17,25 µL | |

As condições de clivagem demonstram bons resultados. Os três genótipos foram observados, predominando o genótipo homozigoto AA, seguido pelo heterozigoto AG, e em menor frequência o genótipo GG (Figura 10).

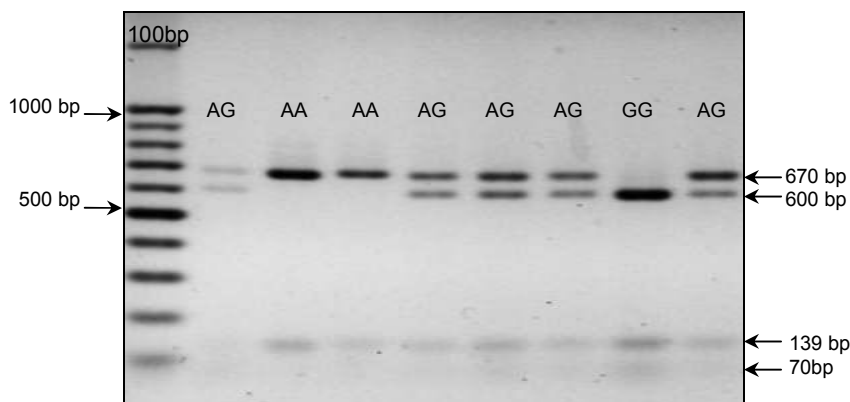


FIGURA 10 – Amostras da população referência TT após clivagem com a enzima *Hpa II*, aplicadas em gel de agarose 1%

3.3. Análise estatística

3.3.1. Frequência genotípica

A análise das frequências revelou a existência dos três genótipos para ambos os SNPs, o que demonstra que os mesmos estão segregando na população estudada.

Para o SNP OPG G217C prevaleceu o genótipo GG (47,65%) e em menor porcentagem o genótipo CC (5,29%). Na análise da frequência, os genótipos estavam distribuídos de maneira semelhante em relação ao sexo (Tabela 9) e incubação.

TABELA 9 – Frequência genotípica do SNP OPG G217C na população referência
TT

| Genótipo | Frequência | Porcentagem | M (%) | F (%) |
|----------|------------|-------------|--------------|--------------|
| CC | 27 | 5,29 % | 12 (2,37) | 15 (2,96) |
| CG | 240 | 47,06 % | 117 (23,12) | 122 (24,11) |
| GG | 243 | 47,65 % | 104 (20,55) | 136 (26,88) |
| Total | 510 | 100 % | 233 (46,05)* | 273 (53,95)* |

* Quatro animais foram desconsiderados na porcentagem em relação ao sexo devido à falta de informações. M – Macho. F – Fêmea

Para o SNP IBSP A211G prevaleceu o genótipo AA (58,43%) e em menor porcentagem o GG (3,33%). Da mesma maneira a frequência em relação ao sexo (Tabela 10) e incubação foi semelhante entre os genótipos.

TABELA 10 – Frequência genotípica do SNP IBSP A211G na população referência
TT

| Genótipo | Frequência | Porcentagem | M (%) | F (%) |
|----------|------------|-------------|--------------|--------------|
| AA | 298 | 58,43 % | 134 (27,07) | 164 (33,13) |
| AG | 195 | 38,24% | 83 (16,77) | 97 (19,60) |
| GG | 17 | 3,33 % | 8 (1,62) | 9 (1,82) |
| Total | 510 | 100 % | 225 (45,45)* | 270 (54,55)* |

* Quinze animais foram desconsiderados na porcentagem em relação ao sexo devido à falta de informações. M – Macho. F – Fêmea

3.3.2. Análise descritiva e de variância

Os resultados da análise descritiva para as características ósseas são mostrados na tabela 11. Em anexo são mostrados os resultados para mais algumas características de desempenho e carcaça.

TABELA 11 – Número de animais (N), média (Med.), desvio-padrão (DP), Mínimo (Min.) e Máximo (Max.) para algumas características ósseas avaliadas

| Características ósseas | N | Med. | DP | Min. | Max. |
|------------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| OSPT (g) | 1436 | 97,91 | 15,01 | 43,5 | 152,7 |
| PTIB (g) | 1433 | 55,66 | 10,24 | 25,4 | 85,4 |
| PFEM (g) | 1435 | 32,51 | 5,57 | 18 | 56,6 |
| PESOTIB (g) | 678 | 11,74 | 2,12 | 7,14 | 17,82 |
| PESOFEM (g) | 677 | 8,50 | 1,37 | 4,41 | 12,68 |
| COMTIB (mm) | 678 | 95,28 | 3,86 | 80 | 106,2 |
| COMFEM (mm) | 677 | 69,56 | 3,10 | 59,3 | 78 |
| ESPTIB (mm) | 678 | 8,76 | 0,92 | 6,0 | 12,9 |
| ESPFEM (mm) | 678 | 8,85 | 0,73 | 7,0 | 11,43 |
| MSTIB (%) | 677 | 50,50 | 3,40 | 39,52 | 64,03 |
| MSFEM (%) | 678 | 51,76 | 3,52 | 43,29 | 62,86 |
| CZTIB (%) | 678 | 22,18 | 1,46 | 17,58 | 28,03 |
| CZFEM (%) | 678 | 21,33 | 1,53 | 15,32 | 28,60 |
| RESTIB (kg) | 678 | 32,05 | 7,94 | 12,85 | 58,46 |
| RESFEM (kg) | 677 | 28,67 | 5,79 | 13,45 | 52,68 |

OSPT – peso do osso do peito, PTIB – peso da tíbia no abate, PFEM – peso do fêmur no abate, PESOTIB – peso da tíbia após abate, PESOFEM – peso do fêmur após abate, COMTIB – comprimento da tíbia, COMFEM – comprimento do fêmur, ESPTIB – espessura da tíbia, ESPFEM – espessura do fêmur, MSTIB – matéria seca da tíbia, MSFEM – matéria seca do fêmur, CZTIB – cinzas da tíbia, CZFEM – cinzas do fêmur, RESTIB – resistência a flexão da tíbia, RESFEM – resistência a flexão do fêmur.

Os resultados do teste F para a análise de variância de algumas características ósseas são mostrados na tabela 12. O efeito de incubação foi altamente significativo ($P < 0.01$) ou significativo ($P < 0.05$) para a maioria das características de desempenho e carcaça, exceto para CAB, CARSCX, COR, MASA, P35, P41, P42, PASA, PES, PNAS, PUL, RCARSCX, RDORS, RMASA, RPUL, RSCX e SCX. Entre as características ósseas ESPTIB, OSPT, PTIB, ROSPT, RPFEM, RPTIB, CZFEM, MSFEM, RESFEM, RESTIB e MSTIB demonstraram efeito significativo ($P < 0,05$) ou altamente significativo ($P < 0.01$) para a incubação.

O efeito de família também foi significativo ($P < 0.05$) ou altamente significativo ($P < 0.01$) para a maioria das características de desempenho e carcaça.

Já para as características ósseas foi observado efeito significativo ($P < 0.05$) ou altamente significativo ($P < 0.01$) para COMTIB, COMFEM, ESPFEM, ESPETIB, PESOTIB, PESOFEM, RPTIB, CZTIB e MSTIB.

O efeito do SNP OPG G217C foi significativo para um menor número de características e altamente significativo ($P < 0.01$) para P21 e RCAB. Em relação à interação sexo e genótipo, o RCAB foi influenciado significativamente, o que demonstra que o efeito do genótipo do SNP OPG G217C é dependente do sexo do animal.

TABELA 12 – Probabilidades obtidas na análise de variância pelo *Teste F* para características ósseas e para o SNP OPG G217C

| Característica | Incubação | Família | Sexo | Genótipo | Sexo e genótipo |
|----------------|-----------|----------|----------|----------|-----------------|
| OSPT | <.0001** | NS | <.0001** | NS | NS |
| PTIB | 0.0348† | NS | <.0001** | NS | NS |
| PFEM | NS | NS | <.0001** | NS | NS |
| PESOTIB | NS | 0.0235* | <.0001** | 0.0860† | NS |
| PESOFEM | NS | 0.0294* | <.0001** | NS | NS |
| COMTIB | NS | 0.0074** | <.0001** | NS | NS |
| COMFEM | NS | 0.0083** | <.0001** | NS | NS |
| ESPTIB | NS | 0.0310* | <.0001** | NS | NS |
| ESPFEM | 0.9791† | 0.0063** | <.0001** | NS | NS |
| MSTIB | <.0001** | 0.0174* | <.0001** | NS | NS |
| MSFEM | <.0001** | 0.1249 | 0.0018** | 0.0740† | NS |
| CZTIB | NS | 0.0050** | 0.0030** | NS | NS |
| CZFEM | <.0001** | NS | NS | NS | NS |
| RESTIB | 0.0002** | NS | <.0001** | 0.0735† | NS |
| RESFEM | <.0001** | NS | <.0001** | NS | NS |

NS = $P > 0.1$. ** Efeito altamente significativo ($P < 0.01$). * Efeito significativo ($P < 0.05$). † Efeito sugestivo ($P < 0.1$)

Alguns resultados para o teste F da análise de variância do SNP OPG A211G são mostrados na tabela 13. Os efeitos de incubação, sexo e família foram altamente significativos ($P < 0.01$) ou significativos ($P < 0.05$) para a maioria das características de desempenho e carcaça.

Para as características ósseas também foi observado influência altamente significativa ($P < 0.01$) ou significativa ($P < 0.05$) para os efeitos de incubação, sexo e família com exceção do COMTIB, COMFEM, ESPFEM e CZTIB para o efeito de

incubação e OSPT, PFEM, PTIB, CZFEM, MSTIB, MSFEM e RESFEM para o efeito de família.

Já o efeito do genótipo do SNP IBSP A211G foi significativo para CZFEM, enquanto que a interação sexo e genótipo foi altamente significativa para CZFEM e significativo para COR, ESPTIB, OSPT e RESTIB (Tabela 13).

TABELA 13 – Probabilidades obtidas na análise de variância pelo teste F para algumas características ósseas e para o SNP IBSP A211G

| Característica | Incubação | Família | Sexo | Genótipo | Sexo e genótipo |
|----------------|-----------|----------|----------|----------|-----------------|
| OSPT | <.0001** | NS | <.0001** | NC | 0.0245* |
| PTIB | 0.0011** | NS | <.0001** | NC | NC |
| PFEM | 0.0002** | NS | <.0001** | NC | NC |
| PESOTIB | 0.0003** | 0.0008** | <.0001** | NC | NC |
| PESOFEM | 0.0295* | 0.0173* | <.0001** | NC | NC |
| COMTIB | NS | 0.0009** | <.0001** | NC | NC |
| COMFEM | NS | 0.0174* | <.0001** | NC | NC |
| ESPTIB | <.0001** | 0.0017** | <.0001** | 0.0583† | 0.0216* |
| ESPFEM | NS | 0.0025** | <.0001** | NC | NC |
| MSTIB | <.0001** | NC | <.0001** | NC | NC |
| MSFEM | <.0001** | NC | 0.0068** | NC | NC |
| CZTIB | NS | 0.0007** | 0.0053** | NC | NC |
| CZFEM | <.0001** | NC | 0.0903† | 0.0206* | 0.0042** |
| RESTIB | <.0001** | <.0001** | <.0001** | NC | 0.0337* |
| RESFEM | <.0001** | NC | 0.0015** | NC | 0.0637† |

NS = $P > 0.1$. ** Efeito altamente significativo ($P < 0.01$). * Efeito significativo ($P < 0.05$). † Efeito sugestivo ($P < 0.1$)

3.3.3. Análise de associação para o SNP OPG G217C

De acordo com as análises de associação realizadas no programa QxPak v. 4.1, o peso ao nascer foi altamente influenciado ($P = 0.107 \text{ E-}10$) pelo efeito aditivo do SNP no gene OPG, sendo influenciado pelo sexo. Os genótipos apresentaram diferenças significativas para o peso ao nascer em aves fêmeas (Figura 11).

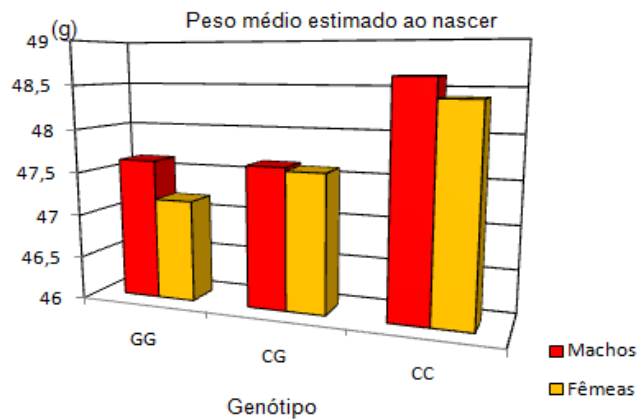


FIGURA 11 – Médias estimadas para o peso ao nascer em machos e fêmeas da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C

As diferenças foram associadas a um efeito aditivo de 0,76 gramas nas fêmeas para cada alelo C adicionado ao genótipo em relação ao genótipo GG. Enquanto aves fêmeas com o genótipo CC apresentaram peso médio estimado ao nascer de 48,4 gramas, as aves fêmeas com os genótipos GC e GG pesaram 47,59 e 47,18 gramas, respectivamente. Uma curva de linearidade foi traçada entre as médias, e confirmou o comportamento próximo do linear ($R^2 = 0.965$), em decorrência do forte efeito aditivo observado. Em machos não foi observado efeito significativo para o peso ao nascer (Figura 12).

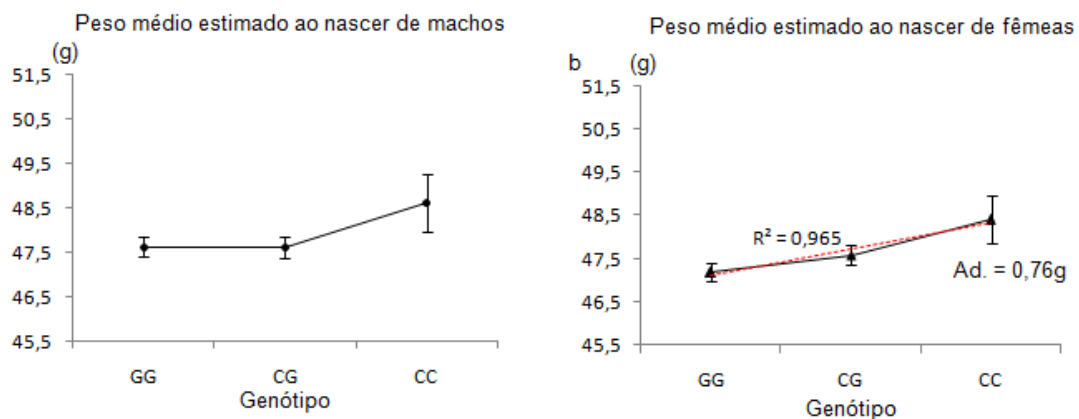


FIGURA 12 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para peso ao nascer em machos (a) e fêmeas (b), em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C

A osteoprotegerina tem sido principalmente associada aos processos de ossificação e reabsorção óssea (YAMADA *et al.*, 2003; HSU *et al.*, 2006) com particular influência sobre BMD – densidade mineral óssea, em humanos. Também existem evidências de que a família de proteínas o qual a osteoprotegerina pertence (superfamília TNF – Fator de Necrose Tumoral) atue em processos de modulação das interações celulares, através da ativação da morte celular, e, portanto, com consequência na taxa de proliferação celular durante o desenvolvimento. Sanders e Wride (1997) observaram a presença de proteínas TNF em células embrionárias de aves, embora não tenham conseguido associar a sua presença com a proliferação celular, como sugerem Kawase *et al.*, 1994.

A possibilidade desta proteína estar envolvida nos processos de morte celular com influência na embriogênese, associada ao fato de que, ao nascer uma parte considerável do peso da ave corresponde ao peso de sua estrutura óssea, podem explicar os resultados altamente significativos observados para o SNP em relação ao peso ao nascer. Outra possível explicação para esse efeito envolve a possibilidade do marcador estar representando o efeito de genes localizados próximos no genoma, e que tenham influência sobre esta característica.

O genótipo do SNP também teve influência sobre o peso aos 21 dias ($P=0.004$), aos 35 ($P=0.04$) e aos 42 dias de idade ($P=0.01$) sem relação com o sexo. Estas características foram associadas a um efeito aditivo com ganhos estimados de 17,72; 25,54; e 35,66 gramas para cada alelo mutante C adicionado ao genótipo, respectivamente, em relação ao genótipo GG. As figuras 13, 14 e 15 mostram as médias estimadas para cada genótipo em relação ao peso aos 21, 35 e 42 dias de idade em aves da população TT.

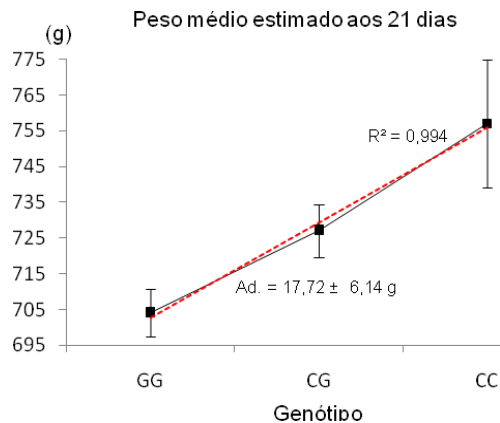


FIGURA 13 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para o peso aos 21 dias em aves da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C

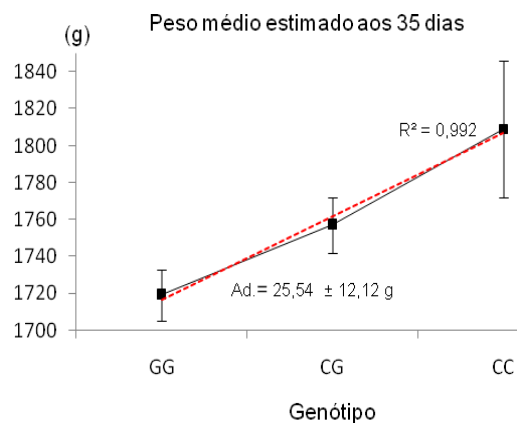


FIGURA 14 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para o peso aos 35 dias em aves da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C

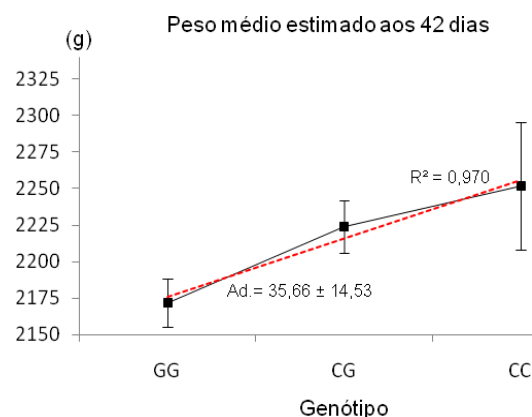


FIGURA 15 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para o peso aos 42 dias em aves da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C

Embora estas características não representem o efeito direto em relação a uma melhor estrutura óssea, é razoável esperar que aves sem problemas de locomoção tenham maior facilidade para se alimentar, menores índices de contaminação e um melhor bem estar de maneira geral. Como destacam Paz, (2008) e Powell e Bittar, (2008), estas consequências se refletem em um maior ganho de peso, que por sua vez, pode estar indiretamente relacionada a uma melhor estrutura óssea.

Os rendimentos de coração ($P=0.04$) e pulmão ($P=0.01$), peso da moela ($P=0.02$) e peso do peito ($P=0.02$) demonstraram efeito aditivo significativo sem influência do sexo, em relação ao SNP OPG G217C, enquanto que o peso da pele das sobre coxas ($p=0.008$) demonstrou efeito aditivo altamente significativo, também sem relação com o sexo. Apesar de a osteoprotegerina ter sido associada a diferentes processos biológicos, não foram encontradas citações da literatura que descrevam sua influência direta sobre estas características em aves. Portanto a hipótese mais provável, é que o efeito observado seja resultado de genes localizados em regiões próximas, e que tenham alguma influência sobre estas variáveis.

O genótipo do SNP também influenciou significativamente o peso do dorso ($P=0.04$), peso da carcaça resfriada ($P=0.03$) e o peso após sangria e depena ($P=0.01$), mas sem relação com o sexo. Em todos os casos o efeito aditivo foi o que melhor explicou os resultados, com o acréscimo estimado de 4,77 gramas, 26,63

gramas e 35,37 gramas em cada característica respectivamente, para cada alelo mutante C adicionado ao genótipo. A tabela 14 mostra o valor do *P-value*, efeito aditivo do SNP e erro padrão para algumas características influenciadas significativamente pelo SNP. Em anexo está a tabela completa com as demais características que demonstram efeito significativo.

TABELA 14 – *P-value*, efeito aditivo estimado do SNP e erro padrão para algumas características com influência significativa do SNP OPG G217C

| Característica | <i>P-value</i> | Efeito Aditivo | Erro padrão |
|-------------------------------|----------------|----------------|-------------|
| Peso aos 21 dias (g) | 0.004** | 17.72 | 6.14 |
| Peso aos 35 dias (g) | 0.04* | 25.54 | 12.12 |
| Peso aos 42 dias (g) | 0.01* | 35.66 | 14.53 |
| Peso carcaça resfriada (g) | 0.03* | 26.63 | 11.84 |
| Peso pele das sobre coxas (g) | 0.008** | 1.83 | 0.69 |
| Peso peito (g) | 0.02* | 9.09 | 3.95 |

** Efeito altamente significativo ($P < 0.01$). * Efeito significativo ($P < 0.05$)

As características de consumo de ração dos 35 aos 41 dias ($P=0.03$), peso do fígado ($P=0.03$), peso do filé do peito ($P=0.006$) e rendimento dos pés ($P=0.03$) apresentaram influência significativa ou altamente significativa do SNP. Foi observado efeito aditivo dentro de sexo para as quatro características. No consumo de ração, peso do fígado e rendimento dos pés, o efeito aditivo foi observado somente em machos, com aumento estimado de 38,87 gramas no consumo de ração dos 35-41 dias, de 2,15 gramas para o peso do fígado e uma redução de 0.064% no rendimento dos pés para cada alelo mutante C adicionado ao genótipo.

Por outro lado, o elevado efeito aditivo identificado para o peso do filé do peito ocorreu somente em aves fêmeas. Os resultados da análise pelo QxPak 4.1, estimaram aumento de 3,23 gramas para cada alelo C adicionado ao genótipo de fêmeas.

O peso das asas ($P=0.005$) e de duas das três partes que a compõem (peso do meio ($P=0.007$) e da ponta ($P=0.003$) das asas) foram altamente influenciadas pelo efeito aditivo do genótipo do SNP sem relação com sexo. A porção óssea representa uma parcela considerável das asas. Portanto é possível que estes resultados representem uma correlação indireta com o desenvolvimento da estrutura

óssea. Para as três características, o acréscimo de cada alelo mutante C representa aumentos nos pesos, com ganho estimado de 1,17 gramas no peso do meio das asas, 0,49 gramas no peso da ponta das asas e de 3,06 gramas no peso das asas.

A média estimada do peso das asas para o genótipo CC foi de 168 gramas, enquanto que para os genótipos CG e GG foram de 164 e 161 gramas, respectivamente. O elevado efeito aditivo foi confirmado pelo perfil de linearidade esperado nas três características, com valores de $R^2 = 0,999$ para o peso do meio das asas e de $R^2 = 0,993$ para a ponta das asas e asas (Figura 16).

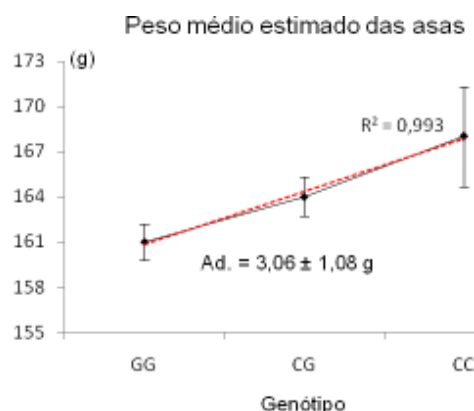


FIGURA 16 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para peso de asas em aves da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C

A resistência a flexão da tíbia foi influenciada significativamente pelo SNP ($P=0.05$) sem relação com o sexo. Foi observado efeito aditivo, com o acréscimo de 1,09Kg de resistência, para cada alelo C adicionado ao genótipo em aves da população TT. A figura 17 mostra o comportamento observado dos genótipos em relação à resistência à flexão, com o valor de $R^2=0,999$, o que demonstra um comportamento muito próximo da linearidade, condição esta que é esperada para características fortemente explicadas pelo efeito aditivo.

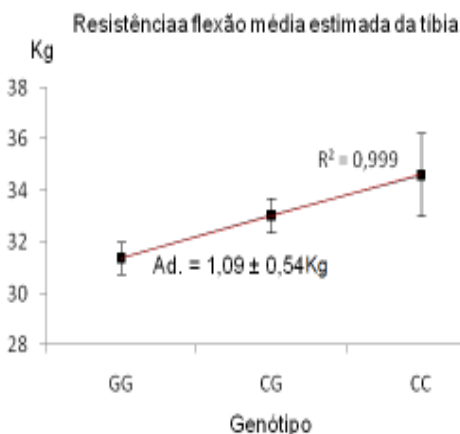


FIGURA 17 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para resistência à flexão da tíbia em aves da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C

O rendimento de cabeça foi altamente influenciado ($P=0.004$) pelo SNP em interação com o sexo. Foi observado efeito aditivo + dominante (Ad + Do) em machos. Machos com o genótipo CC apresentaram rendimento médio estimado de 2,22%, enquanto que machos com os genótipos CG e GG tiveram rendimentos médios de 2,47%, o que leva a crer que existe um considerável efeito de dominância do alelo G neste locus para machos (Figura 18).

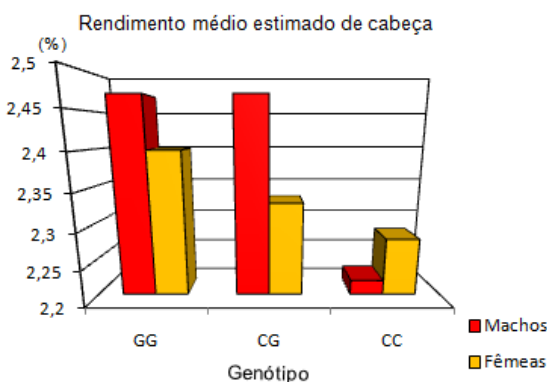


FIGURA18 – Médias estimadas para o rendimento de cabeça em aves da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C

A influência do efeito da dominância dentro do modelo aditivo/ dominante foi avaliada no QxPak v. 4.1 . A análise demonstrou influência significativa sobre o

modelo ($P=0.02$) para machos, confirmando que os resultados obtidos para esta característica são explicados principalmente por este efeito (Figura 19).

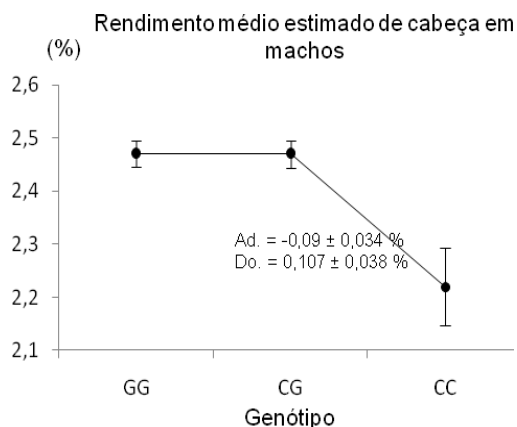


FIGURA 19 – Médias estimadas com o respectivo erro padrão para o rendimento de cabeça em machos da população referência TT, em relação aos genótipos GG, CG e CC do SNP OPG G217C

As análises de associação do SNP OPG G217C demonstraram influência significativa para características diretamente envolvidas com a estrutura óssea, além de características de desempenho e carcaça. Os resultados globais demonstram que este SNP representa um potencial marcador para aves desta população. Os ganhos foram principalmente explicados pelo efeito aditivo, pela presença do alelo mutante C ao genótipo de aves da população referência TT, especialmente para fêmeas. Já as características com efeitos positivos exclusivamente em machos desta população, contrariamente, se devem a presença do alelo G ao genótipo.

O gene osteoprotegerina está localizado no cromossomo dois da galinha, na posição de aproximadamente 141Mb segundo o mapa para *Gallus gallus* do *Animal Genome*, disponível em (www.animalgenome.org/cgi-bin/gbrowse/chicken/#search, acesso em 10/11/2011).

Já foram identificados QTLs significativos neste cromossomo para características envolvidas com a estrutura óssea de aves, entre as quais a densidade mineral óssea (ZHOU *et al.*, 2007), conteúdo mineral ósseo, largura da tíbia (SCHREIWEIS *et al.*, 2005) e comprimento da tíbia (ZHOU *et al.*, 2007).

Alguns estudos, como os de Yamada *et al.*, (2003) e de Hsu *et al.*, (2006), identificaram SNPs no gene para a osteoprotegerina, os quais demonstraram

resultados significativos para a densidade mineral óssea em humanos. Zhou et al., (2007) em seus trabalhos, identificaram uma importante de região de QTL para a densidade mineral óssea em aves. A localização deste QTL no cromossomo dois da galinha está em uma região que engloba o gene para a osteoprotegerina, o que reforça a condição de que este gene tem importante participação sobre o desenvolvimento ósseo, especialmente em relação à densidade dos minerais.

Outros QTLs para algumas das características não diretamente associadas à estrutura óssea, mas que demonstraram resultados significativos em nosso trabalho, já foram identificados, entre os quais para o ganho de peso (OU *et al.*, 2009), peso do músculo do peito (TERCIC *et al.*, 2009) e peso de moela (NAVARRO *et al.*, 2005).

Não foram encontradas na literatura estudos que investigassem SNPs no gene osteoprotegerina de aves e sua associação com características de integridade óssea. Nossos resultados mostram efeitos sobre a estrutura óssea de aves, e reforçam as evidências descritas em pesquisas envolvendo sua caracterização em humanos. Os resultados alcançados neste trabalho podem contribuir, para que, SNPs identificados neste gene sejam utilizados como potenciais marcadores a serem usados em programas de melhoramento, para a seleção de aves com melhor estrutura óssea.

3.3.4. Análise de associação para o SNP IBSP A211G

O peso aos 41 dias teve influência significativa ($P=0.03$) do genótipo do SNP dentro de sexo. Foi estimada uma redução pelo efeito aditivo do SNP de 52,62 gramas para cada alelo mutante G adicionado ao genótipo de aves fêmeas. Em machos foi observado efeito aditivo não significativo no sentido inverso (Tabela 15).

TABELA 15 – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado do SNP e erros padrão para machos e fêmeas com relação ao peso aos 41 dias

| Característica | <i>P-value</i> | Sexo | Efeito Aditivo | Erro padrão |
|----------------------|----------------|-------|----------------|-------------|
| Peso aos 41 dias (g) | 0.03* | Macho | -13,01 | 22,26 |
| | | Fêmea | 52,62 | 20,67 |

* Efeito significativo ($P<0.05$)

Da mesma forma que o SNP no gene osteoprotegerina, um maior peso, especialmente aos 41/42 dias pode demonstrar relações indiretas com uma ave que tenha uma estrutura óssea adequada, embora esta característica dependa de diversas variáveis, tais como as variáveis priorizadas no melhoramento e seleção da linhagem, além de condições nutricionais, zootécnicas e de manejo adequadas.

O peso da pele das coxas também teve efeito aditivo significativo ($P=0.04$), porém sem influência do sexo. Em aves com o genótipo GG o peso médio estimado da pele das coxas foi de 16,04 gramas, enquanto que aves com os genótipos AA e AG tiveram pesos de 16,59 gramas e 17,71 gramas respectivamente. Os resultados da análise no QxPak v. 4.1 demonstram que o acréscimo de cada alelo mutante G ao genótipo, produz redução estimada de 0,81 gramas no peso da pele das coxas (Figura 20).

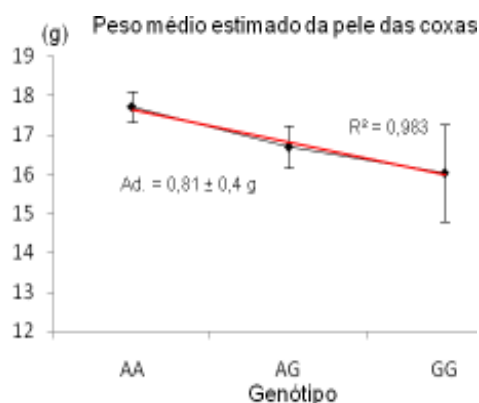


FIGURA 20 – Médias estimadas e respectivo erro padrão do peso da pele das coxas em aves da população referência TT, em relação aos genótipos AA, AG e GG do SNP IBSP A211G

Os pesos do coração e do filé do peito apresentaram resultados altamente significativos para o genótipo do SNP com influência do sexo. Foi observado efeito aditivo para ambas as características, com redução estimada de 0,42 g no peso do coração e de 3,8 g no peso do filé do peito, para cada alelo mutante G adicionado ao genótipo de aves fêmeas (Tabela 16).

TABELA 16 – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado do SNP e erros padrão de machos e fêmeas para peso do coração e peso do filé do peito

| Característica | <i>P-value</i> | Sexo | Efeito aditivo | Erro padrão |
|------------------------|----------------|-------|----------------|-------------|
| Peso do coração (g) | 0.009** | Macho | -0,23 | 0,19 |
| | | Fêmea | 0,42 | 0,17 |
| Peso do filé peito (g) | 0.006** | Macho | 1,35 | 1,28 |
| | | Fêmea | 3,8 | 1,18 |

** Efeito altamente significativo ($P < 0.01$)

Não foram encontrados na literatura trabalhos que associem a sialoproteína óssea com estas características, ou a relações indiretas que tenham influência sobre o peso do coração e do filé do peito. Por isso, levanta-se a hipótese que estes resultados estejam representando o efeito do desequilíbrio de ligação com genes próximos e que tenham influência sobre estas características.

O peso da coxa das asas ($P=0.04$) e das asas ($P=0.01$) apresentou diferenças consistentes entre os genótipos, sendo associadas a um efeito aditivo significativo com influência do sexo. O alelo mutante G foi associado a uma perda estimada de 2,64 gramas no peso da coxa das asas e de 4,58 gramas no peso das asas, para cada alelo G adicionado ao genótipo de aves fêmeas. A tabela 17 mostra o valor do *P-value*, efeito aditivo e erro padrão. No apêndice D, está a tabela completa com as demais características que demonstram efeito significativo para este SNP.

TABELA 17 – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado do SNP e erro padrão para peso da coxa das asas e peso das asas em fêmeas e machos da população referência TT

| Característica | <i>P-value</i> | Sexo | Efeito Aditivo | Erro padrão |
|------------------------|----------------|-------|----------------|-------------|
| Peso coxa das asas (g) | 0.04* | Macho | 0,58 | 1,1 |
| | | Fêmea | 2,64 | 1,02 |
| Peso das asas (g) | 0.01* | Macho | 1,39 | 1,71 |
| | | Fêmea | 4,58 | 1,58 |

* Efeito significativo ($P < 0.05$)

Uma parte considerável das asas correspondente a ossos. Por isso é possível, que o efeito do SNP possa estar representando uma correlação indireta que envolve o desenvolvimento de ossos e sua relação com o peso total das asas.

A espessura da tibia foi altamente influenciada pelo efeito aditivo/ dominante dentro de sexo ($P=0.005$). Aves fêmeas com o genótipo GG apresentaram espessura média estimada de 7,37mm enquanto que fêmeas com os genótipos AG e AA tiveram a espessura média estimada superiores, com 8,13mm e 8,30mm, respectivamente (Figura 21).

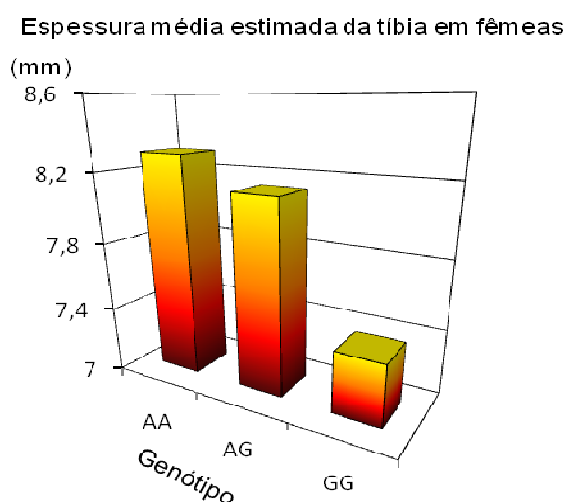


FIGURA 21 – Médias estimadas para a espessura da tibia em fêmeas da população referência TT, em relação aos genótipos AA, AG e GG do SNP IBSP A211G

Os resultados também sugerem que o efeito aditivo produzido pelo acréscimo do alelo A ao genótipo de fêmeas da população referência TT, tem participação importante no ganho do peso da tibia, como é mostrado na Tabela 18.

TABELA 18 – Valor do *P-value*, efeitos aditivo e dominante estimados do SNP e respectivos erros padrão em relação à espessura da tibia em machos e fêmeas da população referência TT

| <i>P Value</i> | Sexo | Efeito aditivo | Erro padrão | Efeito dominante | Erro padrão |
|----------------|-------|----------------|-------------|------------------|-------------|
| 0.005** | Macho | 0,041 | 0,125 | -0,012 | 0,147 |
| | Fêmea | 0,458 | 0,119 | 0,317 | 0,138 |

** Efeito altamente significativo ($P<0.01$)

A amplitude do efeito dominante dentro do modelo aditivo/ dominante, foi avaliada pelo QxPak v. 4.1. A análise para o teste da dominância demonstrou que o seu efeito é apenas sugestivo ($P=0.07$), por isso os ganhos relativos foram estimados usando apenas o modelo aditivo. As análises confirmaram que as diferenças são explicadas principalmente por este efeito, e influenciadas pelo sexo, com redução estimada de 0,27mm para cada alelo G adicionado ao genótipo de fêmeas (Tabela 19).

TABELA 19 – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado do SNP e erro padrão para a espessura da tíbia em fêmeas e machos da população referência TT

| Característica | <i>P-value</i> | Sexo | Efeito Aditivo | Erro padrão |
|----------------------|----------------|-------|----------------|-------------|
| Espessura tíbia (mm) | 0.009** | Macho | 0,05 | 0,09 |
| | | Fêmea | 0,27 | 0,09 |

** Efeito altamente significativo ($P<0.01$)

Estes resultados confirmam a hipótese de que o efeito aditivo é o principal responsável pelas diferenças estimadas, embora o efeito de dominância também exerça influência sobre esta característica.

O peso do osso do peito também apresentou resultados altamente significativos para o modelo aditivo/ dominante com influência do sexo ($P=0.008$). Fêmeas com o genótipo AG tiveram peso médio estimado do osso do peito de 89,81 gramas enquanto que fêmeas com os genótipos AA e GG tiveram peso médio superior e semelhante, o que sugere um efeito negativo de sobredominância neste locus (Figura 22).

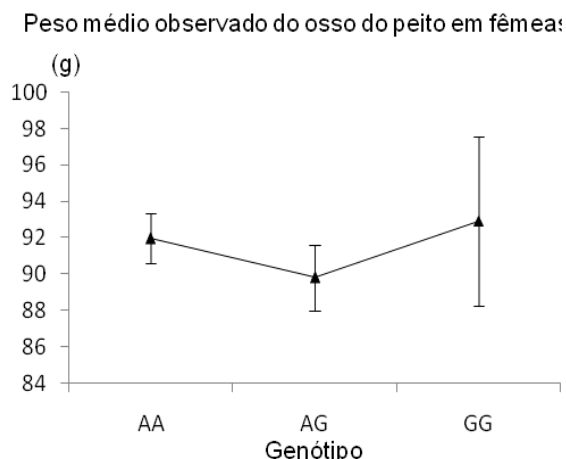


FIGURA 22 – Médias estimadas para com o respectivo erro padrão para o peso do osso do peito em fêmeas da população referência TT, em relação aos genótipos AA, AG e GG do SNP IBSP A211G

O impacto da sobredominância no modelo aditivo/ dominante foi avaliado no QxPak v. 4.1, que revelou influência sugestiva ($P=0.08$). Por isso, uma nova análise, desta vez usando somente o modelo aditivo dentro de sexo, foi realizada. Os resultados mostraram influência significativa ($P=0.01$) do efeito aditivo para fêmeas (Tabela 20).

TABELA 20 – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado do SNP e erro padrão para o peso do osso do peito em fêmeas e machos da população referência TT

| Característica | <i>P-value</i> | Sexo | Efeito Aditivo | Erro padrão |
|------------------------|----------------|-------|----------------|-------------|
| Peso osso do peito (g) | 0.01* | Macho | -1,66 | 1,52 |
| | | Fêmea | 3,75 | 1,41 |

* Efeito significativo ($P<0.05$)

Embora o efeito aditivo tenha demonstrado significância no peso do osso do peito, também pode ser afirmado que a sobredominância exerce forte influência sobre esta característica. Apesar do teste para a sobredominância, dentro do modelo aditivo/ dominante ser apenas sugestivo, é possível que o elevado erro padrão do genótipo GG em relação aos genótipos AA e AG, possa estar influenciando os resultados, e impedindo que o efeito da sobredominância fique mais evidente.

Os resultados significativos observados para este SNP com relação à espessura da tíbia e peso do osso do peito demonstraram uma influência direta do gene sobre estas características. A sialoproteína óssea tem sido relacionada aos processos que levam a formação de cristais de hidroxiapatita (YANG *et al.*, 2010), atuando como um nucleador que inicia a formação dos cristais, que representam um dos principais componentes da estrutura dos ossos. É possível também que o efeito do SNP IBSP A211G esteja refletindo o efeito de genes próximos, tais como o *spp1* (osteopontina), *sparc* entre outros, e que tenham influência sobre os processos de formação e manutenção da estrutura óssea em aves.

Da mesma forma que para a espessura da tíbia e peso do osso do peito, o peso da moela foi significativo para o modelo aditivo/ dominante com influência do sexo ($P=0.007$). Machos com o genótipo GG tiveram peso médio estimado superior aos machos com os genótipos AA e AG, o que sugere um comportamento de dominância do alelo mutante G em machos. Os resultados da análise do efeito da dominância no modelo aditivo/ dominante ($P=0.01$) avaliados no QxPak v. 4.1 confirmaram que de fato a dominância exerce elevada influência para esta característica em machos.

As análises de associação para o SNP IBSP A211G demonstraram resultados significativos para características de desempenho, carcaça e estrutura óssea, caracterizando-o como um potencial marcador, principalmente para aves fêmeas da população referência TT. Os ganhos são essencialmente explicados pelo efeito aditivo, pela presença do alelo A ao genótipo de aves fêmeas.

A investigação do efeito do SNP em cada sexo é importante para aumentar a acurácia da associação entre o marcador e as características fenotípicas. Considerando a existência dessa interação de SNP com sexo, os marcadores podem ter eficiência diferenciada para a seleção de machos ou de fêmeas. Outra característica importante dos marcadores é o seu modo de ação gênica. É necessário investigar se os efeitos do polimorfismo são atribuídos a ação aditiva ou aos desvios da dominância. Considerando que os pais transmitem para os filhos seus alelos e não seus genótipos, uma vantagem de um marcador seria apresentar maior efeito aditivo que de dominância, pois os efeitos de dominância são causados pela interação entre os alelos de um mesmo loco, sendo refeitos a cada geração.

Da mesma maneira que para a osteoprotegrina, investigações envolvendo a caracterização deste gene para características de integridade óssea, se resumem a

estudos para fins de saúde humana. A sialoproteína óssea está localizada no cromossomo 4 da galinha, na posição de aproximadamente 47Mb segundo o mapa para *Gallus gallus* do *Animal Genome*, disponível em (www.animalgenome.org/cgi-bin/gbrowse/chicken/#search, acesso em 12/11/2011).

QTLs significativos neste cromossomo foram identificados e associados com características envolvidas com a estrutura óssea de aves, entre as quais com o conteúdo mineral ósseo (ZHOU *et al.*, 2007), densidade mineral do osso da tíbia, diâmetro da medula tibial (SHARMAN *et al.*, 2007), espessura da tíbia (SCHREIWEIS *et al.*, 2005) e peso do osso da coxa (DE KONING *et al.*, 2003). Destes QTLs, os correspondentes ao diâmetro da medula tibial e a espessura da tíbia, estão localizados em regiões do cromossomo quatro da galinha que englobam o gene para a sialoproteína óssea. Em nosso trabalho o SNP IBSP A211G demonstrou ser significativo para a espessura do osso da tíbia, o que reforça a possibilidade deste gene ter forte influência sobre esta característica.

Também já foram identificados QTLs para outras características significativas em nosso estudo, tais como para o peso aos 42 dias (WAHLERG *et al.*, 2009), peso das asas (IKEOBI *et al.*, 2004) e peso do coração (ZHOU *et al.*, 2006).

Os resultados deste estudo reforçam as evidências descritas em pesquisas envolvendo a investigação deste gene em humanos, sobre características relacionadas com a integridade óssea. Isso amplia a possibilidade de usar SNPs deste gene como marcadores para a estrutura óssea de aves.

O estudo de marcadores associados à integridade óssea poderá ser importante para diminuição dos impactos da exploração avícola sobre o bem-estar das aves. Os conhecimentos gerados irão contribuir para a dissecação da arquitetura genética permitindo a identificação dos genes envolvidos no controle de características da integridade óssea, fornecendo subsídios para a elaboração de estratégias de melhoramento genético das aves.

Os marcadores avaliados nesse projeto poderão ser incorporados em programas de melhoramento genético de aves por meio de diferentes estratégias de seleção assistida por marcadores, uma vez que seus efeitos sejam validados nas linhas puras onde se praticará a seleção. Uma possível estratégia de uso dos marcadores na avaliação genética seria o diagnóstico dos alelos favoráveis à melhoria da qualidade óssea nas aves candidatas a seleção, permitindo o descarte precoce dos animais que não contribuem para melhoria dessas características na

população, e assim, diminuir o custo com seleção e permitir a obtenção de ganhos genéticos mais rápidos para essas características, melhorando também o bem-estar animal.

4. CONCLUSÕES

- Observa-se associação significativa entre características de desempenho, carcaça e estrutura óssea e o SNP OPG G217C no gene osteoprotegerina, entre as quais, peso ao nascer, peso aos 42 dias, peso das asas e resistência a flexão da tíbia.
- Observa-se associação significativa entre características de desempenho, carcaça e estrutura óssea e o SNP IBSP A211G no gene sialoproteína óssea, entre as quais, peso aos 41 dias, peso das asas, peso do osso do peito e espessura da tíbia.
- O efeito dos SNPs OPG G217C e A211G foi influenciado pelo sexo das aves, com resultados significativos especialmente para fêmeas da população referência TT.
- Os polimorfismos avaliados nos genes osteoprotegerina e sialoproteína óssea representam potenciais marcadores para características de integridade óssea em aves.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, G. A.A.; SAMBEEK, F. M. J.P. van; VENINGA, G. Tendências de Mercado e de Tecnologias em Genética Avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos, **Anais...** Campinas: FACTA, p.391-399, 2008.

BARBOSA, A. A. **Aspectos químicos, bioquímicos, físicos e mecânicos de fêmures de frango de corte**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.64-71, 2009.

COOK, M.E. Skeletal Deformities and Their Causes: Introduction. **Poultry Science**, v.79, p.982-984, 2000.

DE KONING, D. J.; WINDSOR, D.; HOCKING, P. M.; BURT, D. W.; LAW, A.; HALEY, C. S.; MORRIS, A.; VINCENT, J.; GRIFFIN, H. Quantitative trait locus detection in commercial broiler lines using candidate regions. **Journal of Animal Science**, v.81, n.5, p.1158-1165, 2003.

HSU, Y.-H.; NIU, T.; TERWEDOW, H.; XU, X.; FENG, Y.; LI, Z.; BRAIN, J. D.; ROSEN, C. J.; LAIRD, N.; XU, X. Variation in genes involved in the the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. **Human Genetics**, v.118, p.568-577, 2006.

IKEOBI, C. O. N.; WOOLLIAMS, J. A.; MORRICE, D. R.; LAW, A.; WINDSOR, D.; BURT, D. W.; HOCKING, P. M. Quantitative trait loci for meat yield and muscle distribution in a broiler layer cross. **Livestock Production Science**, v.87, p.143-151, 2004.

KAWASE, E.; YAMAMOTO, H.; HASHIMOTO, K.; NAKATSUJI, N. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture. **Developmental Biology**, v.161, p.91-95, 1994.

LEDUR, M. C.; PEIXOTO, J. O.; SCHIMIDT, G. S. Novos rumos da genética no desenvolvimento avícola. **Revista Avicultura Industrial**, v. 102, n. 1196, p.12-16, 2011.

NAVARRO, P.; VISSCHER, P. M.; KNOTT, S. A.; BURT, D. W.; HOCKING, P. M.; HALEY, C. S. Mapping of quantitative trait loci affecting organ weights and blood variables in a broiler layer cross. **British Poultry Science**, v.46, n.4, p.430-442, 2005.

OU, J. T.; TANG, S. Q.; SUN, D. X.; ZHANG, Y. Polymorphisms of three neuroendocrine-correlated genes associated with growth and reproductive traits in the chicken. **Poultry Science**, v.88, p.722-727, 2009.

PEIXOTO, J. O.; SAATKAMP, M. G.; TESSMANN, A. L.; FIGUEIREDO, E. A. P.; MUNARI, D. P.; LEDUR, M. C. Avaliação genética de características de desempenho em população referência para validação de estudos genômicos em frangos de corte. In: VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 2010, Maringá, **Anais...** Maringá: SBMA, 2010.

PÉREZ-ENCISO, M.; MISZTAL, I. QxPak: A versatile mixed model application for genetical genomics and QTL analyses. **Bioinformatics**, v.20, p.2792-2798, 2004.

PAZ, I. C. L. A. Problemas Locomotores e Técnicas de Mensuração. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos, **Anais...** Campinas: FACTA, p.57-68, 2008.

POWELL, K. C.; BITTAR, I. Filho. Atualidades em Problemas Locomotores em Frangos de Corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos, **Anais...** Campinas: FACTA, p.187-196, 2008.

RATH, N. C.; HUFF, G.R.; HUFF, W.F.; BALOG, J.M. Factors Regulating Bone Maturity and Strength in Poultry. **Poultry Science**, v.79, p.1024-1032, 2000.

SANDERS, E.J.; WRIDE, M. A. Roles for Growth and Differentiation Factors in Avian Embryonic Development. **Poultry Science**, v.76, p.111-117, 1997.

SAS Institute Inc. 2008. **SAS/STAT® 9.2**. User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SCHREIWEIS, M. A.; HESTER, P. Y.; MOODY, D. E. Identification of quantitative trait loci associated with bone traits and body weight in an F2 resource population of chickens. **Genetics Selection Evolution**, v.37, p.677-698, 2005.

SIEGEL, P.B.; DODGSON, J.B.; ANDERSSON, L. Progress from Chicken Genetics to the Chicken Genome. **Poultry Science**, v.85, p.2050-2060, 2006.

SHARMAN, P. W.; MORRICE, D. R.; LAW, A. S.; BURT, D. W.; HOCKING, P. M. Quantitative trait loci for bone traits segregating independently of those for growth in an F2 broiler x layer cross. **Cytogenetic and Genome Research**, v.117, p.296-304, 2007.

TERCIC, D.; HOLCMAN, A.; DOVC, P.; MORRICE, D. R.; BURT, D. W.; HOCKING, P. M.; HORVAT, S. Identification of chromosomal regions associated with growth and carcass traits in an F(3) full sib intercross line originating from a cross of chicken lines divergently selected on body weight. **Animal Genetics**, v.40, n.5, p.743-748, 2009.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R. J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.3688-3691, 2003.

WAHLBERG, P.; CARLBORG, O.; FOGGIO, M.; TORDOIR, X.; SYVANEN, A-C.; LATHROP, M.; GUT, I. G.; SIEGEL, P. B.; ANDERSSON, L. Genetic analysis of an (F2) intercross between two chicken lines divergently selected for body-weight. **BMC Genomics**, v.10, p.248, 2009.

YAMADA, Y.; ANDO, F.; NIINO, N.; SHIMOKATA, H. Association of polymorphisms of the osteoprotegerin gene with bone mineral density in Japanese women but men. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.80, p.344-349, 2003.

YANG, Y.; QIANG, C.; SAHAI, N. How Does Bone Sialoprotein Promote the Nucleation of Hydroxyapatite? A Molecular Dynamics Study Using Model Peptides of Different Conformations. **Langmuir**, v.26, n.12, p.9848-9859, 2010.

ZHOU, H.; DEEB, N.; EVOCK-CLOVER, C.M.; ASHWELL, C. M.; LAMONT, S. J. Genome-Wide Linkage Analysis to Identify Chromosomal Regions Affecting Phenotypic Traits in the Chicken. II. Body Composition. **Poultry Science**, v.85, p.1712-1721, 2006.

ZHOU, H.; DEEB, N.; EVOCK-CLOVER, C.M.; MITCHELL, A. D.; ASHWELL, C. M.; LAMONT, S. J. Genome-Wide Linkage Analysis to Identify Chromosomal Regions Affecting Phenotypic Traits in the Chicken. III. Skeletal Integrity. **Poultry Science**, v.86, p.255-266, 2007.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- Polimorfismos foram identificados em nove dos dez fragmentos sequenciados, sendo um total de noventa e dois polimorfismos de base única (SNP) e uma inserção de cinco nucleotídeos.
- Houve associação significativa para características de desempenho, carcaça e estrutura óssea no SNP OPG G217C, entre as quais, peso ao nascer, peso aos 42 dias, peso das asas e resistência a flexão da tíbia em aves da população referência TT.
- Houve associação significativa para características de desempenho, carcaça e estrutura óssea no SNP IBSP A211G entre as quais, peso aos 41 dias, peso das asas, peso do osso do peito e espessura da tíbia em aves da população referência TT.
- O efeito dos SNPs estudados foi influenciado pelo sexo das aves, cujos resultados significativos se referem especialmente a fêmeas da população referência TT.
- Os genes estudados representam potenciais marcadores para características envolvidas com o desenvolvimento da estrutura óssea em aves.

APÊNDICES

Apêndice A: Composição dos tampões de diluição para as enzimas de restrição *Bsr I* e *Hpa II*:

Bsr I (New England BioLabs Inc.): 300mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 500µg/ ml BSA e 50% de glicerol (pH 7,4 a 25°C).

Hpa II (New England BioLabs Inc.): 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200µg/ ml BSA e 50% de glicerol (pH 7,4 a 25°C).

Apêndice B: Médias, desvio padrão, mínimos e máximos de algumas características de desempenho e carcaça

TABELA 1 – Número de animais (N), média (Med.), desvio padrão (DP), Mínimo (Min.) e Máximo (Max.) para algumas características de desempenho e carcaça

| Característica de desempenho | N | Med. | DP | Min. | Max. |
|------------------------------|------|---------|--------|-------|-------|
| PNAS (g) | 1449 | 47,66 | 3,70 | 37,4 | 61,8 |
| P21 (g) | 1427 | 648,29 | 133,96 | 256 | 1034 |
| P42 (g) | 1452 | 2223,86 | 260,24 | 988 | 2971 |
| CA 35-41 | 1440 | 2,31 | 0,47 | 1,42 | 5,25 |
| RC (%) | 1436 | 73,63 | 1,65 | 63,56 | 79,78 |
| RCX (%) | 1420 | 9,24 | 0,62 | 7,26 | 12,15 |
| RSCX (%) | 1426 | 13,94 | 0,95 | 9,70 | 16,88 |
| RPT (%) | 1425 | 22,54 | 1,39 | 17,27 | 27,15 |
| RCOR (%) | 1420 | 0,56 | 0,07 | 0,39 | 0,91 |
| RMO (%) | 1422 | 1,45 | 0,25 | 0,82 | 2,40 |
| RFIG (%) | 1421 | 2,36 | 0,33 | 1,28 | 3,73 |
| RPUL (%) | 1429 | 0,69 | 0,10 | 0,35 | 1,13 |
| RDORS (%) | 1424 | 11,88 | 0,85 | 7,99 | 14,95 |

PNAS – peso ao nascer, P21 – peso aos 21 dias de idade, P42– peso aos 42 dias de idade, CA 35-41 – conversão alimentar, RCA – rendimento de carcaça, RCX – rendimento das coxas, RSCX – rendimento das sobrecoxas, RPT – rendimento do peito, RCOR – rendimento do coração, RMO – rendimento da moela, RFIG – rendimento do fígado, RPUL – rendimento do pulmão, RDORS – rendimento do dorso

Apêndice C – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado, efeito dominante estimado e erros padrão para características significativas do SNP OPG G217C (Gene Osteoprotegerina)

TABELA 1 – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado e erros padrão para características com significância para o modelo aditivo sem influência de sexo para o SNP OPG G217C

| Característica | <i>P-value</i> | Efeito aditivo | Erro padrão |
|--------------------------------|----------------|----------------|-------------|
| Peso aos 21 dias (g) | 0.004 | 17.72 | 6.14 |
| Peso aos 35 dias (g) | 0.04 | 25.54 | 12.12 |
| Peso aos 42 dias (g) | 0.01 | 35.66 | 14.53 |
| Peso após sangria e depena (g) | 0.01 | 35.37 | 13.88 |
| Peso carcaça resfriada (g) | 0.03 | 26.63 | 11.84 |
| Peso moela (g) | 0.02 | 0.95 | 0.41 |
| Peso pele das sobre coxas (g) | 0.008 | 1.83 | 0.69 |
| Peso Dorso (g) | 0.04 | 4.77 | 2.28 |
| Força tibia (Kg) | 0.05 | 1.09 | 0.54 |
| Rendimento do coração (%) | 0.04 | -0.011 | 0.0052 |
| Peso peito (g) | 0.02 | 9.09 | 3.95 |
| Rendimento pulmão (%) | 0.01 | -0.0179 | 0.0074 |
| Peso meio das asas (g) | 0.007 | 1,17 | 0.43 |
| Peso ponta das asas (g) | 0.003 | 0.49 | 0,18 |
| Peso asas (g) | 0.005 | 3,06 | 1,08 |

** Efeito altamente significativo (P<0.01). * Efeito significativo (P<0.05)

TABELA 2 – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado e erros padrão para características com significância para o modelo aditivo com influência do sexo para o SNP OPG G217C

| Característica | <i>P-value</i> | Sexo | Efeito aditivo | Erro padrão |
|------------------------------|----------------|-------|----------------|-------------|
| Peso ao nascer (g) | 0.107 E-10 | Macho | 0.28 | 0.29 |
| | | Fêmea | 0.76 | 0.26 |
| Consumo ração 35-41 dias (g) | 0.03 | Macho | 38.87 | 16.35 |
| | | Fêmea | 20.56 | 14.66 |
| Peso fígado (g) | 0.03 | Macho | 2.15 | 0.87 |
| | | Fêmea | 0.93 | 0.8 |
| Peso filé do peito (g) | 0.006 | Macho | 1.64 | 1.19 |
| | | Fêmea | 3.23 | 1.08 |
| Rendimento dos pés (%) | 0.03 | Macho | -0.064 | 0.025 |
| | | Fêmea | -0.028 | 0.022 |

** Efeito altamente significativo (P<0.01). * Efeito significativo (P<0.05)

TABELA 3 – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado, efeito dominante estimado e erros padrão para características com significância para o modelo aditivo/ dominante com influência do sexo para o SNP OPG G217C

| Característica | <i>P-value</i> | Sexo | Efeito aditivo | Erro padrão | Efeito dominante | Erro padrão |
|--------------------------|----------------|-------|----------------|-------------|------------------|-------------|
| Rendimento de cabeça (%) | 0,004 | Macho | -0.09 | 0.034 | 0.107 | 0.038 |
| | | Fêmea | -0.05 | 0.029 | -0.013 | 0.035 |

** Efeito altamente significativo (P<0.01)

Apêndice D – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado, efeito dominante estimado e erros padrão para características significativas do SNP IBSP A211G (Gene Sialoproteína óssea)

TABELA 1 – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado e erros padrão para características com significância para o modelo aditivo sem influência de sexo para o SNP IBSP A211G

| Característica | <i>P-value</i> | Efeito aditivo | Erro padrão |
|-------------------------|----------------|----------------|-------------|
| Peso pele das coxas (g) | 0.04 | 0,81 | 0,4 |

* Efeito significativo (P<0.05)

TABELA 2 – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado e erros padrão para características com significância para o modelo aditivo com influência do sexo para o SNP IBSP A211G

| Característica | <i>P-value</i> | Sexo | Efeito aditivo | Erro padrão |
|------------------------|----------------|-------|----------------|-------------|
| Peso aos 41 dias (g) | 0.03 | Macho | -13.01 | 22.26 |
| | | Fêmea | 52.62 | 20.67 |
| Peso coração (g) | 0.009 | Macho | -0.23 | 0.19 |
| | | Fêmea | 0.42 | 0.17 |
| Peso coxa das asas (g) | 0.04 | Macho | 0.58 | 1.1 |
| | | Fêmea | 2.64 | 1.02 |
| Peso filé do peito (g) | 0.006 | Macho | 1.35 | 1.28 |
| | | Fêmea | 3.8 | 1.18 |
| Peso das asas (g) | 0.01 | Macho | 1.39 | 1.71 |
| | | Fêmea | 4.58 | 1.58 |

** Efeito altamente significativo (P<0.01). * Efeito significativo (P<0.05)

TABELA 3 – Valor do *P-value*, efeito aditivo estimado, efeito dominante estimado e erros padrão para características com significância para o modelo aditivo/ dominante com influência do sexo para o SNP IBSP G211C

| Característica | <i>P-value</i> | Sexo | Efeito aditivo | Erro padrão | Efeito dominante | Erro padrão |
|------------------------|----------------|-------|----------------|-------------|------------------|-------------|
| Peso moela (g) | 0.007 | Macho | -1,28 | 0,96 | -3,4 | 1,11 |
| | | Fêmea | 1,22 | 0,91 | 0,045 | 1,04 |
| Peso osso do peito (g) | 0.008 | Macho | -3,16 | 2,27 | -2,32 | 2,62 |
| | | Fêmea | 0,33 | 2,14 | -5,2 | 2,47 |
| Espessura tíbia (mm) | 0.005 | Macho | 0,041 | 0,125 | -0,012 | 0,147 |
| | | Fêmea | 0,458 | 0,119 | 0,317 | 0,138 |

** Efeito altamente significativo ($P < 0.01$)